

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Pediatría



SECUENCIACIÓN MASIVA EN FALLOS
MEDULARES CONGÉNITOS

Tesis doctoral presentada por:
Eva Gálvez de la Villa

Directores de la tesis:
Julián Sevilla Navarro
Elena Vallespín García



EL DR. JULIÁN SEVILLA NAVARRO MÉDICO ADJUNTO
DEL SERVICIO DE HEMATOLOGÍA DEL HOSPITAL
INFANTIL UNIVERSITARIO NIÑO JESÚS Y LA DRA.
ELENA VALLESPÍN GARCIA ESPECIALISTA EN
GENÉTICA MOLECULAR EN EL INSTITUTO DE GENÉTICA
MÉDICA Y MOLECULAR LA PAZ

Certifican: Que Dña. EVA GÁLVEZ DE LA VILLA, Licenciada
en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección un
trabajo titulado “Secuenciación masiva en fallos medulares
congénitos”, para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Dicho trabajo reúne las condiciones de originalidad y rigor
metodológico necesarias para ser sometido a lectura y discusión
ante el Tribunal.

En Madrid, diciembre de 2018.

Fdo. Julián Sevilla

Fdo. Elena Vallespín

AGRADECIMIENTOS

Todos los acontecimientos importantes de la vida se dan porque se acompañan de personas maravillosas, y esta tesis lo corrobora. Hay mucha gente que ha contribuido a que sea posible que exista este documento y aquí nombro a las más importantes.

En primer lugar, quiero agradecer a Luis Madero, jefe del Servicio de Onco-Hematología y Trasplante del Hospital Niño Jesús, la oportunidad que me brindó hace ya casi cuatro años de poder trabajar en su equipo. Gracias a eso he podido desarrollarme profesional y personalmente, por lo que le estaré eternamente agradecida.

A mis padres, que siempre me motivaron a crecer en todos los aspectos de mi vida. Gracias por sacrificaros siempre para darnos lo mejor y por creer en mí más que yo misma, sin vosotros no hubiera creído posible llegar donde estoy. A mi hermano, al que admiro profundamente, gracias por enseñarme que con esfuerzo los sueños pueden cumplirse.

A mis compañeros, técnicos, enfermeras, oncólogos y sobre todo mis compañeras de despacho Julia, Elena y Josune. Gracias a todos por ayudarme y apoyarme todo este tiempo, por escucharme los días buenos y también los malos. Especialmente a Josune, gracias por haberme dado en estos últimos meses lo que más necesitaba: el tiempo para llegar hasta aquí, sin tu ayuda no hubiera sido posible.

A todos aquellos que dentro del CIBERER me han ayudado a aprender en el campo de los fallos medulares, tanto a nivel clínico como molecular y de laboratorio. Sois muchos, pero cada uno de vosotros me habéis aportado conocimientos valiosísimos que me han servido para estar donde estoy. Gracias de corazón.

A mi directora Elena, gracias por la paciencia, por la inestimable ayuda en un campo que me era desconocido, por estar siempre que lo he necesitado, incluyendo las confidencias aceleradas en tu despacho. Ya sabes que sin ti tanto mi tesis como todo el proyecto que lo rodea no hubiera sido posible.

A Julián, director de esta tesis, jefe, compañero, hermano mayor, amigo. Gracias por ayudarme a crecer, por confiar siempre en mí, por los consejos y sobre todo por proponerme esta aventura apasionante. Eres un ejemplo continuo de superación y es un privilegio trabajar y aprender al lado de alguien tan brillante.

A mi pequeña familia. A Carmen, gracias por alegrarnos el alma a tu padre y a mí, eres lo mejor que nos ha pasado y espero que algún día cuando leas esta tesis sepas que me ayudaste a conseguirlo simplemente existiendo. Por último, Tomás. Mi compañero de vida, mi otra mitad, la persona que más se enorgullece de todo lo que consigo. Gracias por animarme siempre a ser mejor y por ser el mejor ejemplo. No hubiera podido llegar donde estoy sin tus ánimos, tus consejos y por supuesto tu confianza ciega en mí.

ÍNDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Concepto y epidemiología	9
1.2 Características comunes a los SFMC.....	13
1.2.1 Manifestaciones clínicas: solapamiento y heterogeneidad.....	13
1.2.2 Síndromes de fallo medular y cáncer	14
1.2.3 Heterogeneidad genética.....	16
1.3 Principales síndromes asociados a fallo medular	19
1.3.1 Anemia de Fanconi (AF)	19
1.3.1.1 Aspectos generales.....	19
1.3.1.2 Aspectos clínicos	19
1.3.1.3 Aspectos genéticos y moleculares	21
1.3.1.4 El diagnóstico en Anemia de Fanconi	24
1.3.2 Disqueratosis Congénita (DC).....	25
1.3.2.1 Aspectos generales.....	25
1.3.2.2 Aspectos clínicos	25
1.3.2.3 Aspectos genéticos y moleculares	28
1.3.2.4 El diagnóstico en Disqueratosis Congénita	32
1.3.3 Ribosomopatías	35
1.3.3.1 Síndrome de Shwachman Diamond (SSD).....	37
1.3.3.1.1 Aspectos generales	37
1.3.3.1.2 Aspectos clínicos.....	37
1.3.3.1.2.1 Alteraciones hematológicas	38
1.3.3.1.2.2 Alteraciones gastrointestinales.....	38
1.3.3.1.2.3 Alteraciones esqueléticas	39
1.3.3.1.3 Aspectos genéticos y moleculares	39
1.3.3.1.4 El diagnóstico en SSD	40
1.3.3.2 Anemia de Blackfan-Diamond (ABD)	43
1.3.3.2.1 Aspectos generales	43
1.3.3.2.2 Aspectos clínicos.....	43
1.3.3.2.3 Aspectos genéticos y moleculares	45
1.3.3.2.4 El diagnóstico en ABD	46
1.3.4 Trombopenia Amegacariocítica Congénita (TAC)	48
1.3.5 Neutropenia Congénita Grave (NCG)	49

1.3.6	Otros síndromes que asocian fallo medular.....	51
1.3.7	SFMC inclasificables o fenotípicamente indefinidos (SFMC-I).....	53
1.4	El proceso diagnóstico en los SFMC	57
1.4.1	Importancia del diagnóstico en los SFMC	57
1.4.2	El diagnóstico en los SFMC	58
1.4.2.1	Evaluación clínica.....	59
1.4.2.1.1	Historia clínica	59
1.4.2.1.2	Historia familiar	60
1.4.2.1.3	Examen físico	60
1.4.2.1.4	Datos de laboratorio	62
1.4.2.1.4.1	Hematología.....	62
1.4.2.1.4.2	Test de fragilidad cromosómica (TFC).....	62
1.4.2.1.4.3	Longitud de telómeros (LT).....	63
1.4.2.1.4.4	Estudios de función pancreática.....	63
1.4.2.1.4.5	ADA eritrocitario	64
1.4.2.1.5	Estudios moleculares	64
1.5	Introducción al diagnóstico genético: de Sanger a NGS	67
1.5.1	Aplicaciones de las técnicas NGS.	71
1.5.1.1	Secuenciación del genoma completo (WGS)	71
1.5.1.2	Secuenciación del exoma completo (WES).....	71
1.5.1.3	Secuenciación de paneles de genes (TGS)	72
1.5.2	Aplicación de las técnicas NGS en el diagnóstico de SFMC	73
1.5.3	Principales limitaciones de las técnicas NGS.....	77
2.	HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN	81
2.1	Hipótesis	83
2.2	Justificación	83
3.	OBJETIVOS	85
3.1	Objetivos.....	87
4.	PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS	89
4.1	Pacientes	91
4.2	Material y métodos	93
4.2.1	Registro de datos clínicos	93
4.2.2	Selección de genes candidatos.....	93
4.2.3	Técnicas moleculares empleadas.....	101

4.2.3.1	PCR convencional (Reacción en cadena de la polimerasa)	101
4.2.3.2	Secuenciación automática clásica o Sanger	102
4.2.3.3	MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)	103
4.2.3.4	Microarrays de SNP (Single Nucleotide Polymorphism)	104
4.2.3.5	Secuenciación masiva	105
4.2.3.5.1	Método de secuenciación masiva	105
4.2.4	Diseño del panel	107
4.2.5	Análisis bioinformático	108
4.2.5.1.1	Preprocesamiento de datos	108
4.2.5.1.2	Control de calidad	108
4.2.6	Análisis de variantes	111
4.2.6.1	Filtrado de variantes	111
4.2.6.2	Clasificación de las variantes	112
4.2.7	Análisis del rendimiento del panel	117
5.	RESULTADOS	121
5.1	Características de los pacientes	123
5.1.1	Distribución de pacientes grupo FMD	125
5.1.2	Distribución de pacientes grupo FMI	126
5.2	Análisis del rendimiento del panel NGS	127
5.2.1	Análisis de los parámetros de calidad	127
5.2.2	Muestras rechazadas	143
5.2.3	Validación del panel	144
5.3	Análisis de la capacidad diagnóstica del panel NGS	145
5.3.1	Resultados de la serie	145
5.3.2	Resultados del grupo FMD	147
5.3.2.1	Resultados por patologías dentro del grupo FMD	149
5.3.2.1.1	Eritroblastopenia	149
5.3.2.1.2	Anemia de Fanconi (AF)	151
5.3.2.1.3	Disqueratosis congénita (DC)	157
5.3.2.1.4	Síndrome Shwachman-Diamond (SSD)	159
5.3.2.1.5	Trombopenia congénita (TC)	161
5.3.2.1.6	Neutropenias	167
5.3.3	Resultados del grupo FMI	169
5.3.3.1	Caso 1: pacientes 08001 y 08003	169

5.3.3.2	Caso 2: paciente 20001	174
5.3.3.3	Caso 3: paciente 23001	175
5.3.3.4	Caso 4: paciente 10003	177
5.3.3.5	Caso 5: paciente 21001	179
5.3.3.6	Caso 6: paciente 01015	180
5.3.4	Correlación entre motivo de estudio y diagnóstico molecular	181
5.3.5	Análisis de pacientes no diagnosticados.....	182
6.	DISCUSIÓN	187
6.2	Capacidad de detección del panel	191
6.3	Capacidad diagnóstica según el fenotipo: fallo medular definido (FMD).....	195
6.4	Capacidad diagnóstica según el fenotipo: fallo medular indefinido (FMI) ...	197
6.5	Análisis de las patologías con mayor tasa diagnóstica: Anemia de Blackfan Diamond, Anemia de Fanconi y Disqueratosis Congénita	203
6.5.1	Anemia de Blackfan Diamond	203
6.5.2	Anemia de Fanconi	209
6.5.3	Disqueratosis Congénita.....	213
6.6	Análisis de las patologías con menor tasa diagnóstica: Síndrome de Shwachman Diamond y Neutropenia Congénita Grave	217
6.6.1	Síndrome Shwachman-Diamond.....	217
6.6.2	Neutropenia Congénita Grave	221
6.7	Análisis del grupo de trombopenia congénita.....	223
6.8	Diagnóstico molecular e implicaciones clínicas de los SFMC.....	227
6.9	Pacientes no diagnosticados.....	229
6.10	Ventajas y limitaciones del estudio	231
7.	CONCLUSIONES	233
8.	BIBLIOGRAFÍA	237
9.	ANEXOS	261
9.1	Anexo I: Consentimiento informado estudio NGS	263
9.2	Anexo II: Consentimiento informado biobanco	271
9.3	Anexo III: Registro de datos clínicos	285
9.4	Anexo IV: Clasificación ACMG	293

CLAVE DE ABREVIATURAS

ABD	Anemia de Blackfan Diamond
ACMG	Escuela Americana de genética y genómica médica (del inglés, <i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>)
AD	Autosómico dominante
ADAe	Adenosin desaminasa eritrocitaria
ADC	Anemia diseritropoyética congénita
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Anemia de Fanconi
AM	Aplasia medular
AR	Autosómico recesivo
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
CGH	Hibridación genómica comparative (del inglés, <i>Comparative genomic hybridization</i>)
CNV	Variación en el número de copias (del inglés, <i>Copy number variations</i>)
DC	Disqueratosis congénita
ddNTPs	Didesoxinucleótidos trifosfato
DEB	Diepoxibutano
DHT	Doble heterocigosis
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
FISH	Hibridación fluorescente in situ (del inglés, <i>Fluorescent in situ hybridization</i>)
FMD	Fallo medular definido
FMI	Fallo medular indefinido
FMO	Fallo de médula ósea
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática
HbF	Hemoglobina fetal
HM	Homocigosis
HT	Heterocigosis
ICL	Entrecruzamiento de ADN (del inglés, <i>Interstrand cross-link</i>)

LLA	Leucemia linfóide aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
LOH	Pérdida de heterocigosidad (del inglés, <i>Loss of heterozygosity</i>)
LT	Longitud telomérica
MAF	Frecuencia del alelo menos común (del inglés, <i>Minor allele frequency</i>)
MMC	Mitomicina C
MPLA	Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (del inglés, <i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>)
NCG	Neutropenia congénita grave
NGS	Secuenciación masiva o de nueva generación (del inglés, <i>Next generation sequencing</i>)
OMIM	<i>On mendelian inheritance in man</i>
PB	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>Polymerase chain reaction</i>)
ROI	Región de interés (del inglés, <i>Region of interest</i>)
rTPO	Receptor de trombopoyetina
SFMC	Síndromes de fallo medular congénito
SFMC-I	Síndrome de fallo medular congénito clasificable
SMD	Síndrome mielodisplásico
SNP	Polimorfismo de nucleótido único (del inglés, <i>Single nucleotide polymorphism</i>)
SSD	Síndrome Shwachman Diamond
TAC	Trombopenia Amegacariocítica Congénita
TAR	Trombopenia con ausencia de radio
TFC	Test de fragilidad cromosómica
TGS	Secuenciación dirigida o paneles de genes (del inglés, <i>Targeted gene sequencing</i>)
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
VOUS	Variante de significado incierto (del inglés, <i>Variants of unknown significance</i>)

WES	Secuenciación completa del exoma (del inglés, <i>Whole exome sequencing</i>)
WGS	Secuenciación completa del genoma (del inglés, <i>Whole genome sequencing</i>)

Introducción: Los síndromes de fallo medular congénito (SFMC) son un grupo heterogéneo de enfermedades de base genética que se caracterizan por tener un gran solapamiento fenotípico, lo que hace que el diagnóstico basado en la presentación clínica es muy complejo. La caracterización molecular es esencial para dar el diagnóstico definitivo, administrar el tratamiento más adecuado y establecer el pronóstico. Las herramientas de secuenciación masiva parecen ofrecer una plataforma útil para definir genéticamente las enfermedades con alta heterogeneidad genética como son los SFMC.

Objetivos:

- Analizar el rendimiento del panel de secuenciación masiva diseñado para pacientes con sospecha de fallo medular congénito.
- Analizar la capacidad diagnóstica del panel de secuenciación masiva en todos los pacientes con sospecha de fallo medular congénito incluidos en el estudio.
- Analizar si la capacidad diagnóstica del panel NGS difiere entre los distintos grupos clínicos de este estudio.
- Desarrollar una estrategia de estudio que incluya técnicas de secuenciación masiva para el diagnóstico molecular de los SFMC.

Metodología: Se ha diseñado un panel NGS de 128 genes asociados al desarrollo de fallo medular congénito (FMC). Se han obtenido 130 muestras de pacientes que han sido secuenciadas y analizadas por el equipo bioinformático en el instituto de genética médica y molecular (INGEMM) del Hospital La Paz. Para la secuenciación se ha utilizado la plataforma NextSeq (Illumina Roche). El análisis bioinformático ha sido orientado a la identificación de mutaciones puntuales y deleciones e inserciones de pequeños fragmentos de ADN.

Resultados: De las 130 muestras procesadas, 5 no fueron aptas para el análisis y 10 se incluyeron como controles positivos. Finalmente se estudiaron un total de 115 muestras sin diagnóstico molecular previo. En el 44% (51/115) se detectaron mutaciones asociadas a la enfermedad del paciente. Del total de muestras analizadas, el 75% (86/115) fueron incluidas en el grupo FMD, obteniéndose un ratio diagnóstico del 51% (44/86). EL 25% restante se incluyeron en el grupo FMI, encontrándose mutación causal en el 24% de los pacientes (7/29).

Conclusiones: las técnicas NGS son una opción útil para el diagnóstico de pacientes con FMC. En nuestra serie, hemos alcanzado una tasa diagnóstica del 44%, coincidiendo con lo descrito en la literatura. Sigue existiendo un porcentaje de pacientes sin diagnóstico genético, que parece ser más evidente en el grupo FMI, lo que sugiere que la capacidad diagnóstica de estas técnicas difieren entre los diferentes fenotipos estudiados.

Background: Inherited bone marrow failure syndromes (IBMFSs) are a heterogeneous group of genetic disorders, characterized by being very clinically similar, resulting in complex diagnosis. Molecular characterization is essential in order to establish diagnosis, treatment and prognosis. Next-generation sequencing (NGS) techniques seem to be a useful platform for genetically defining different IBMFSs. Therefore we have designed a NGS panel with the objective of making a specific, fast and cost-effective diagnosis for these diseases.

Objectives:

- To analyze the NGS panel yield designed for patients with bone marrow failure syndrome.
- To analyze the diagnostic yield of NGS panel in all patients with suspected IBMFSs.
- To analyze whether the diagnostic capacity of the NGS panel differs between the clinical groups.
- To develop a study strategy that includes NGS techniques in molecular diagnosis of SFMC.

Methods: We developed a NGS panel of 128 genes involved in different IBMFSs. A total of 130 samples have been processed. Patients were classified into two groups: unclassified IBMFS (UBMFS) and classified IBMFS (CBMFS). For the NGS study the NextSeq platform of Illumina (Roche) has been used. Bioinformatic analysis has been oriented to the identification of point polymorphisms (SNPs) and insertions / deletions of small DNA fragments.

Results: Of the 130 samples processed, 4% (5/130) was not suitable for analysis and 10 were positive controls. A total of 115 patients were studied. In 44% (51/115) causal mutations were detected. From the total samples analyzed (115), 75% (86/115) were included in the CBMFS patient group, obtaining a diagnostic yield of 51% (44/86). The remaining 25% (29/115) was included in the UBMFS patient group and we found causal mutation in 24% (7/29). There remains a percentage of patients without a genetic diagnosis, which seems more evident in the UBMFS group.

Conclusions: NGS techniques are a useful option for the diagnosis of IBMFSs patients. In our serie, we have reached a diagnosis in 44%, coinciding with that described in the literature. Undiagnosed patients should be included in research projects and programs.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Concepto y epidemiología

Los síndromes de fallo medular congénito (SFMC) son trastornos genéticos de baja prevalencia, que como su propio nombre indica, tienen como característica principal la insuficiencia medular. Esta insuficiencia o fallo medular se origina como consecuencia del fracaso en la producción de células sanguíneas, lo que conduce al desarrollo de una o varias citopenias en sangre periférica. Esta alteración en la función de la médula ósea no solo se manifiesta por pancitopenia periférica, sino que además asocian mayor incidencia de síndromes mielodisplásicos (SMD) y leucemias, así como de tumores sólidos^{1 2}.

Los SFMC incluyen un amplio abanico de enfermedades, habiéndose descrito hasta la fecha más de 30 síndromes que asocian fallo medular. Entre ellos, la anemia de Fanconi (AF), la disqueratosis congénita (DC), la anemia Blackfan-Diamond (ABD), el síndrome de Shwachman-Diamond (SSD), la trombocitopenia amegacariocítica congénita (TAC), la neutropenia congénita grave (NCG) o la trombocitopenia con ausencia de radio (TAR) están entre los tipos más comunes³.

Los datos epidemiológicos precisos con respecto a los SFMC son difíciles de obtener y no existen cifras de incidencia concretas. Sin embargo, las series de casos pueden aportar información orientativa sobre la frecuencia de algunos SFMC específicos, aunque estos datos pueden variar entre unos países y otros. Por ejemplo, el registro israelí, con un total de 127 pacientes incluidos, ofrece datos que indican que en esta población el SFMC más frecuente es la AF con un 52% de los casos, seguida por NCG con un 17% y ABD con el 14%, el resto se reparte entre TAC, DC, SSD y TAR⁴. Sin embargo, si analizamos los datos aportados por la última actualización del registro canadiense de SFMC, estas frecuencias varían. De los 530 pacientes incluidos en este registro, las frecuencias de AF, ABD y DC son muy similares, correspondiendo al 30%, 25% y 37% respectivamente⁵.

En algunos SFMC concretos, la prevalencia es conocida. Por ejemplo, según Orphanet⁶ la incidencia descrita de AF y DC es de 1-9 casos/1.000.000 nacidos vivos. En el caso de la ABD se ha descrito una incidencia de 7/1.000.000 nacidos vivos según los datos publicados por el consorcio europeo de ABD⁷. Sin embargo, la prevalencia de SFMC en la población general es desconocida. En base a los datos publicados para las

poblaciones canadienses, el número esperado de casos nuevos de SFMC en España sería de 30-50 por año, aunque se estima que puede haber un número hasta 10 veces mayor de casos sospechosos de padecerlos. Este hecho se debe a que el diagnóstico definitivo lo da la caracterización molecular y, dado que realizarla hasta hace poco era un proceso lento y costoso, hay muchos pacientes sin diagnóstico definitivo e infradiagnosticados. De hecho, de los pacientes afectos de aplasia medular (AM), se estima que hasta un 10-25% podrían tener un origen congénito^{8 9}.

Como se ha comentado, existe un gran número de síndromes que podrían definirse como SFMC. Cada uno de ellos tiene características propias que son las que los definen, sin embargo, a su vez presentan una serie de manifestaciones comunes. Se resumen en la tabla 1.1 las características generales de los SFMC más frecuentes.

SFMC	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	HALLAZGOS DE LABORATORIO	CÁNCER ASOCIADO	MECANISMO MOLECULAR
AF	Talla baja, malformaciones en radio y pulgares, microcefalia, manchas café con leche, malformaciones renales	Pancitopenia, macrocitosis, aumento de HbF, aumento de roturas cromosómicas inducidas	SMD, LMA, carcinoma escamoso de cabeza y cuello	Alteración de la reparación del ADN mediante vía FA/BRCA
TAC	No reportadas	Trombocitopenia, megacariocitos disminuidos	Algún caso reportado de LLA y SMD	Alteración regulación megacariocítica a nivel medular
DC	Alteraciones de la pigmentación cutánea, leucoplaquia oral, fibrosis pulmonar, estenosis esofágica, alteraciones hepáticas	Pancitopenia, macrocitosis, aumento de HbF, longitud telomérica acortada	SMD, LMA, carcinoma escamoso de piel, cabeza y cuello	Defectos en la biología telomérica
ABD	Talla baja, malformaciones craneofaciales esqueléticas, pulgares trifalángicos	Anemia, aumento de ADA eritrocitario, macrocitosis, aumento de HbF	SMD, LMA, LLA, osteosarcoma, cáncer de colon, otros	Defectos en la biogénesis y procesamiento ribosomal
NCG	Infecciones severas	Neutropenia	SMD, LMA	Mielocatexis
SSD	Insuficiencia pancreática exocrina, anomalías esqueléticas	Neutropenia, disminución de isoamilasa y tripsinógeno sérico	SMD, LMA, LLA	Defectos en la biogénesis y procesamiento ribosomal

Tabla 1.1 Características generales de los SFMC más frecuentes

1.2 Características comunes a los SFMC

Los SFMC, además de estar asociados a insuficiencia de la médula y ser tanto genética como clínicamente muy heterogéneos, presentan una serie de características comunes como las que se describen a continuación.

1.2.1 Manifestaciones clínicas: solapamiento y heterogeneidad

La clínica de todos estos síndromes es extremadamente heterogénea. Pacientes con las mismas alteraciones genéticas pueden presentar espectros clínicos completamente distintos. Así, podemos ver pacientes que tienen malformaciones importantes a nivel renal o alteraciones esqueléticas con la misma herencia genética que sus hermanos, que no tienen ninguna manifestación clínica. O pacientes afectados por alguno de estos síndromes que son diagnosticados en la edad adulta por la ausencia de manifestaciones clínicas, que presentan la misma base genética que otros pacientes que desarrollan fallo medular grave en la primera década de la vida. La historia clínica y la exploración física deberían orientar al diagnóstico de estos pacientes, aunque en muchas ocasiones, solo podremos aproximarnos a la sospecha de fallo medular congénito, sin ser capaces de orientar dentro de este gran grupo de síndromes cuál puede ser el más probable.

Sin embargo, aunque exista una gran heterogeneidad en los aspectos clínicos que puede orientarnos al diagnóstico, no hay que olvidar que en estos pacientes la presentación clínica no siempre permite discriminar entre los distintos SFMC o diferenciarlos de aquellos adquiridos, ya que existe un gran solapamiento fenotípico que dificulta el diagnóstico basado en las manifestaciones clínicas. Un ejemplo claro es la talla baja, signo común en muchos de los SFMC. Por otra parte, muchos pacientes no presentan anomalías físicas. Por ejemplo, el 30% de los pacientes con AF no tiene ninguna malformación¹⁰ e incluso en determinados casos las anomalías físicas pueden aparecer a lo largo de la vida y no al nacimiento, como la distrofia ungueal en la DC o la displasia metafisaria en el SSD⁹. Esta similitud de la sintomatología clínica podría tener una explicación molecular, ya que el fallo en las rutas de reparación del ADN, la deficiencia en la biogénesis del ribosoma o los defectos en la elongación y estabilidad telomérica pueden ser comunes en varios de estos síndromes^{10 11}.

1.2.2 Síndromes de fallo medular y cáncer

Las alteraciones moleculares responsables del desarrollo de los SFMC, además de ser las responsables del fallo medular, afectan a funciones biológicas que no son exclusivas de las células del sistema hematopoyético. A día de hoy aún se desconoce el origen fisiopatológico de la deficiencia medular en muchos de los SFMC. Sin embargo, se postula que la vía p53 podría estar activada en la mayoría de ellos, explicando así tanto el fallo medular como la predisposición a cáncer¹². Entre las funciones biológicas más afectadas en este tipo de síndromes se encuentran las que implican a la estabilidad cromosómica, la elongación de los telómeros, la biogénesis ribosomal y funciones del ADN mitocondrial. Dependiendo de la ruta alterada se alterarán diferentes funciones celulares, sin embargo, todas ellas derivarán en alteraciones en la supervivencia, longevidad y transformación celular.

Dada la asociación entre SFMC y genes implicados en los mecanismos de reparación del ADN, no sorprende que muchos SFMC tengan una alta predisposición a malignidad. AF, DC, SSD y TAC a menudo se presentan con AM y pueden evolucionar hacia SMD y LMA. Los casos de ABD, NCG, y TAR suelen presentarse con una única citopenia que rara vez evoluciona a AM. Sin embargo, estos casos asocian un mayor riesgo de leucemia. Los tumores sólidos de cabeza y cuello, y carcinoma de células escamosas se asocian con AF y DC, y el sarcoma osteogénico con ABD^{13 9}.

Estos datos han sido avalados por los publicados por el *National Cancer Institute* donde se analizan más de 500 pacientes afectos de SFMC con un seguimiento de 15 años¹⁴. En dicha publicación se relaciona el desarrollo de cáncer en los SFMC y la necesidad de recibir un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). Al igual que en otras series publicadas anteriormente, la patología con mayor tasa de cáncer es la AF, siendo los más frecuentes los tumores de cabeza y cuello (principalmente lengua), LMA, cáncer de vulva, esófago y sistema nervioso central. La DC sigue de cerca a la AF, con tumores de cabeza y cuello, LMA y Linfoma.

En el caso de la ABD, los cánceres más frecuentes son SMD/LMA en pacientes no trasplantados, carcinoma de colon y sarcoma osteogénico¹⁵. Sin embargo, comparado con otros SFMC, en el caso de ABD el riesgo de cáncer es sustancialmente menor. Basados en los datos del registro norteamericano de ABD, se estima que la incidencia de

cáncer en pacientes con esta patología es 5.4 veces superior que en la población general siendo 39-71 veces mayor en AF y 11 veces mayor en DC^{7 5}.

En esta serie también se describe la incidencia de recibir un trasplante, siendo la incidencia acumulada de recibir un TPH a los 50 años del 70% en AF y del 50% en DC. La tasa de riesgo anual de muerte no maligna fue del 3-5% en AF a los 10 años, y 1-2% en niños con DC. Menos del 10% de los pacientes con ABD o SSD recibieron TPH⁵.

1.2.3 Heterogeneidad genética

Como se ha señalado previamente, los SFMC tienen su origen en diferentes alteraciones genéticas. Este origen genético se caracteriza por ser muy heterogéneo, es decir, un mismo fenotipo o cuadro clínico se puede producir por mutaciones en diferentes genes, siguiendo en la mayoría de los casos un modelo de transmisión monogénico.

Estas alteraciones moleculares incluyen genes implicados en la biogénesis de los ribosomas, como los asociados con ABD¹⁶ y SSD¹⁷, en el mantenimiento de los telómeros como la DC¹⁸ o aquellos que regulan procesos implicados en la reparación del ADN, como es el caso de la AF¹⁹. Aparte de la aplicación directa del conocimiento genético para el manejo clínico de los pacientes, el descubrimiento de genes asociados a SFMC ayuda a conceptualizar el conocimiento de las vías biológicas implicadas en la patogénesis de estos síndromes, con el objetivo final de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. Dada la baja incidencia de estas patologías, el estudio de las bases genéticas solo ha sido reportado a través de series de casos, por lo que hay que asumir que es difícil conocer con exactitud la prevalencia de genes mutados y los tipos de mutaciones²⁰.

No obstante, hasta la fecha han sido descritos más de 180 genes implicados en el desarrollo de SFMC. En la tabla 1.2 se describen los genes asociados a los SFMC más frecuentes. El gran número de genes descritos y el descubrimiento creciente de nuevos genes involucrados en estas enfermedades, hace que su análisis sea difícil utilizando técnicas convencionales de secuenciación, ya que la estrategia de estudio gen a gen es lenta y costosa.

SÍNDROME	GENES ASOCIADOS
Anemia de Fanconi	<i>FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1/BRCA2, FANCD2/ FANCD, FANCE/FACE, FANCF/FAF, FANCG/XRCC9, FANCI/KIAA1794, FANCIJ/BACH1, FANCL/FAAP43, FANCM/FAAP250, FANCN/PALB2, FANCO/RAD51C, FANCP/SLX4, FANCQ/ERCC4, FANCR/RAD51, FANCS/BRCA1, FANCT/UBE2T, FANCU/XRCC2</i>
Disqueratosis congénita	<i>DKC1, TERC, TERT, TINF2, NOP10/NOLA3, NHP2/NOLA2, TCAB1/WRAP53, RTEL1, CTC1, NHEJ1/XLF, ACD, PARN, POT1</i>
Anemia de Blackfan-Diamond	<i>RPS19, RPS24, RPS17, RPL35A, RPL5, RPL11, RPS7, RPS10, RPS26, RPL26, RPL15, RPS29, RPL31, GATA1, RPL19, RPL27, RPS27, RPS28, TSR2</i>
Neutropenia congénita grave	<i>CSF3R, ELANE/ELA2, GFII1, HAX1, G6PC3, WAS/SCNX, CXCR2, JAGN1, TCIRG1, VPS45, CLBP</i>
Síndrome Shwachman-Diamond	<i>SBDS</i>
Trombopenia amegacariocítica congénita	<i>MPL</i>

Tabla 1.2: Genes asociados a los SFMC más frecuentes

1.3 Principales síndromes asociados a fallo medular

Como se ha comentado previamente existe un elevado número de síndromes que asocian fallo medular. Sin embargo la AF, DC, ABD y SSD son las patologías más características dentro de este grupo. Otros como la TAC o NCG, quizás no lo son tanto pero tienen particularidades que deben mencionarse. A continuación se describen las características principales de estos síndromes.

1.3.1 Anemia de Fanconi (AF)

1.3.1.1 Aspectos generales

La AF es un síndrome complejo asociado a inestabilidad cromosómica ocasionada por mutaciones en genes responsables de la reparación de ADN²¹. Se caracteriza por insuficiencia medular progresiva, anomalías somáticas constitutivas e hipersensibilidad a agentes que producen entrecruzamientos en las cadenas del ADN, tales como mitomicina C (MMC) y diepoxibutano (DEB). Es característica de la enfermedad una mayor predisposición a desarrollar SMD, leucemias agudas y tumores sólidos. La prevalencia de la AF es de 1-9 pacientes por millón, con una frecuencia de portadores heterocigotos de entre 0,3 y 1 %, y se distribuye en todas las razas y grupos étnicos^{22 11}. La mediana de edad en el momento del diagnóstico es de 7 años, desde el nacimiento hasta la edad adulta, con un ligero predominio en el género masculino (1.2:1)^{3 23}.

1.3.1.2 Aspectos clínicos

La presentación clínica de la AF es muy variada. Los pacientes con AF generalmente desarrollan grados variables de pancitopenia en la infancia, frecuentemente asociada a alteraciones cutáneas y otras anomalías congénitas^{24 21}. En muchos casos las malformaciones congénitas están presentes desde el nacimiento, pero el diagnóstico solo se alcanza cuando los pacientes desarrollan el fracaso medular. Las anomalías congénitas más características se detallan en la tabla 1.3.

LOCALIZACIÓN (FRECUENCIA)	ANOMALÍAS
Piel (64%)	Manchas “café con leche”, hiperpigmentación, áreas hipopigmentadas
Crecimiento (61%)	Retardado, estatura corta
Cabeza y cara (60%)	Base nasal ancha, <i>epicantus</i> , micrognatia, microcefalia, trigonocefalia, abombamiento frontal, despegamiento de pabellón auricular, orejas de implantación bajas
Pulgares, mano, radio (51%)	Hipoplasia tenar, ausencia o hipoplasia del pulgar, clinodactilia, pulgar supernumerario o trifalángico, sindactilia, ausencia o hipoplasia de radio
Ojos (43%)	Microftalmia, estrabismo, <i>epicantus</i> , hipertelorismo, cataratas, astigmatismo
Riñones y tracto urinario (35%)	Riñones ectópicos o en herradura, hipoplásicos o ausentes, displasia, duplicaciones ureterales, hidronefrosis, hidrouréter, reflujo
Esqueleto (30%)	Espina bífida, escoliosis, anomalías en costillas y vértebras, Sprengel, Klippel-Feil
Genitales (19%)	En varones: hipogenitalismo, hipospadias, testes no descendidos o atróficos, micropene En mujeres: hipoplasia en vagina y útero, atresia
Corazón (16%)	<i>Ductus</i> arterioso, defectos del septo interventricular, coartación aórtica, tetralogía de Fallot
Tracto digestivo (14%)	Atresia esofágica, duodenal o anal, fístula traqueoesofágica, paladar ojival
Oídos (11%)	Sordera o hipoacusia, atresia, displasia
Sistema nervioso central (7%)	Hiperreflexia, hidrocefalia, parálisis de Bell, malformaciones arteriales

Tabla 1.3: Alteraciones congénitas más frecuentes en Anemia de Fanconi

Aproximadamente el 30% de los pacientes son diagnosticados al detectarse trombocitopenia y/o macrocitosis, ya que son las alteraciones hematológicas iniciales más frecuentes. Sin embargo, la pancitopenia aparece al diagnóstico en aproximadamente la mitad de los casos. Más de un tercio de los pacientes afectados de AF presentan anomalías en extremidades superiores como pulgares hipoplásicos o agenesia de radio. Otras anomalías congénitas asociadas a AF incluyen microcefalia, cara triangular de "Fanconi", anomalías renales y cardíacas²⁴.

Sin embargo, alrededor del 30% de los pacientes con AF no tienen anomalías congénitas¹⁰. En estos casos, el fallo medular, la leucemia o el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello de inicio temprano pueden ser la característica principal. Se estima que hasta un 1% de pacientes afectados de LMA que tienen recuperaciones tórpidas tras quimioterapia podrían padecer AF no diagnosticada²⁵. Aproximadamente el 40% de los pacientes con AF desarrollan fallo medular grave a los 20 años de edad y la mitad de todos ellos lo desarrollan a los 50 años. El riesgo de padecer tumores sólidos o LMA a los 50 años en AF se estima en 30% y 10% respectivamente²⁶.

1.3.1.3 Aspectos genéticos y moleculares

Desde el punto de vista genético, la herencia de variantes patogénicas en genes que son clave en el proceso de reparación del ADN, produce la enfermedad. Ya han sido descritos hasta 22 genes asociados a la enfermedad, siendo el patrón de herencia en la mayoría de los casos autosómico recesivo (*FANCA*, *FANCC*, *BRCA2/FANCD1*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *BRIP1/FANCI/BACH1*, *FANCL*, *FANCM*, *PALB2/FANCN*, *RAD51C/FANCO*, *SLX4/FANCP*, *ERCC4/FANCG/XPF*, *RAD51/FANCR*, *BRCA1/FANCS*, *UBE2T/FANCT*, *XRCC2/FANCU*)^{24 27}. Son la excepción los casos relacionados con el gen *FANCB*, localizado en el cromosoma X²⁸, y los que afectan al gen *FANCR* (*RAD51*), que es de herencia dominante²⁹. Recientemente se identificaron variantes patógenas en *MAD2L2/REV7* en un paciente con AF, expandiéndose de nuevo el fenotipo molecular³⁰.

De entre todos estos genes, las mutaciones en el gen *FANCA* son las que están más representadas, ya que más del 50% de los pacientes poseen mutaciones en este gen. En concreto, en el área mediterránea la frecuencia de mutaciones en el gen *FANCA* se ha descrito en hasta el 80% de los casos³¹.

Para entender la biología molecular de la AF, es importante destacar que esta célula muestra una frecuencia anormalmente alta de roturas cromosómicas espontáneas, lo que supone el origen de las manifestaciones clínicas y biológicas de la enfermedad. La vía FA/BRCA interviene en la reparación de entrecruzamientos de ADN (del inglés *Interstrand cross-link* –ICL–), enlaces covalentes entre cadenas de ADN que crean un obstáculo para la replicación y transcripción del ADN. Las ICL son producidas por productos químicos endógenos y exposiciones ambientales, incluidos los psoralenos naturales y los fármacos alquilantes, como el cisplatino^{32 33}. FANCA, -B, -C, -E, -F, -G, -L, -M y 3 proteínas asociadas, FAAP100, FAAP24 y FAAP20 comprenden el "complejo del *core*" que posee actividad ubiquitina ligasa E3 y reside en FANCL. La presencia de todas las proteínas del *core* es esencial para la activación por monoubiquitinación de las proteínas FANCD2 y FANCI. El heterodímero FANCD2 y FANCI ubiquitinado es un componente clave del proceso de reparación del ADN. Ambas proteínas componen el complejo central de la ruta, denominado "complejo ID", necesario para que las proteínas del tercer grupo puedan translocarse a las regiones dañadas del ADN. Este tercer grupo de proteínas está integrado por FANCD1/BRCA2, FANCI/BRIP, FANCN/PALB2, FANCO/RAD51C, FANCP/SLX4, FANCDQ/XPF, FANCR/RAD51, FANCS/ BRCA1, FANCU/XRCC2 y FANCV/REV7³⁴. Todos los genes que codifican para este tercer grupo de proteínas menos FANCP/SLX4 y FANCDQ/XPF son supresores de tumores.

Otros componentes de la vía FA/BRCA tienen funciones distintas pero relacionadas en la reparación del ADN. FANCP (también denominado SLX4) y FANCDQ (ERCC4) crean el complejo de nucleasa que se requiere para activar la vía de reparación NER (del inglés *Nucleotide Excision Repair*). FANCD1 (BRCA2), FANCI (BRIP1), FANCN (PALB2) y FANCO (RAD51C) actúan en la recombinación homóloga y reparación de la vía BRCA/RAD51³⁵.

Toda esta ruta comentada anteriormente está estrechamente regulada y se encarga de la reparación del ADN (Imagen 1.1). Además de dar lugar al fallo medular, la reparación defectuosa del ADN está relacionada con un incremento del riesgo de cáncer en pacientes con AF, ya que hace que las células sean más susceptibles a las mutaciones en los genes descritos anteriormente y que podrían iniciar el proceso carcinogénico. Las exposiciones ambientales, como el tabaquismo, el alcohol o los medicamentos podrían contribuir al proceso carcinogénico en FA³⁶.

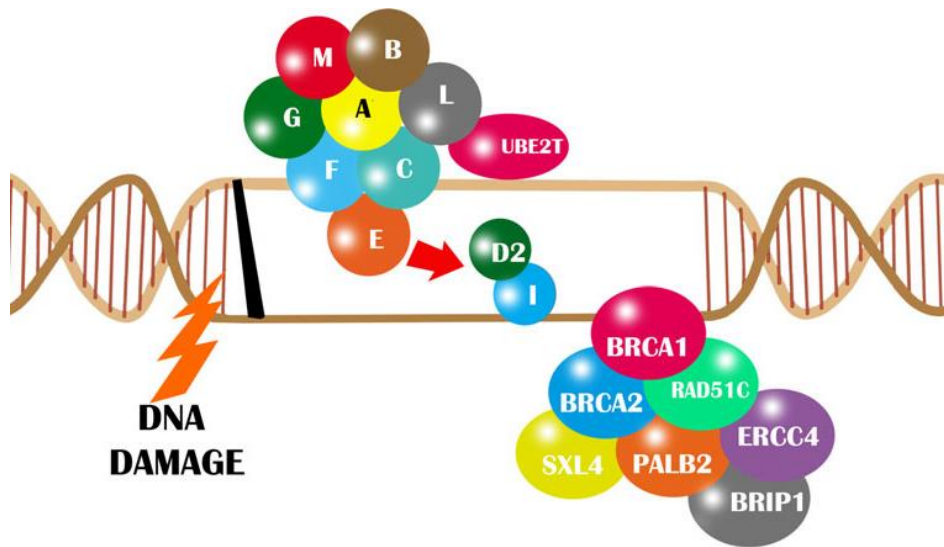


Imagen 1.1: Ruta BRCA/FA de reparación de ADN.

Después del daño en el ADN, las proteínas FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM (representadas por A, B, C, E, F, G, L, M) y UBE2T/FANCT forman el “complejo del core” que se requiere para la ubiquitinación de las proteínas FANCI (I) y FANCD2 (D2), que son a su vez, requeridas para el complejo de D2 ubiquinado (I) (Complejo ID), así como BRCA1/FANCS, PALB2/FANCN, BRIP1/FANCI/BACH1, BRCA2/FANCD1, RAD51C/FANCO, ERCC4/FANQ y SLX4/FANCP que constituirán el foco necesario para reparar el daño del ADN. No se muestra, pero también son clave para la reparación del ADN y REV7/ MAD2L2 y XRCC2. Modificado de Wegman-Ostrosky y Savage. British Journal of Haematology, 2017, 177, 526–542

1.3.1.4 El diagnóstico en Anemia de Fanconi

Las características clínicas y las alteraciones hematológicas son en la mayoría de los casos orientativas del diagnóstico. En ausencia de malformaciones, la orientación diagnóstica de una hipoplasia medular no es tan evidente y con frecuencia debe distinguirse de los cuadros de aplasia medular adquirida. Esto es aún más crítico cuando se trata de pacientes con mielodisplasias infantiles.

En el 75% de los aspirados y/o biopsias de médula ósea iniciales se halla celularidad reducida, rasgos diseritropoyéticos y aumento relativo de linfocitos y macrófagos. En el 10-15% puede hallarse inicialmente una celularidad normal e incluso eritropoyesis aumentada. La eritropoyesis tiene rasgos “fetales”: con macrocitosis, hemoglobina fetal (HbF) alta y presencia de antígeno-i.

El test de fragilidad o de inestabilidad cromosómica (TFC), es la prueba diagnóstica principal en la AF. Mediante esta prueba se analizan las lesiones cromosómicas, principalmente roturas cromosómicas y cromatídicas, inducidas por agentes que producen entrecruzamientos en el ADN, tales como DEB o MMC ³⁷.

Actualmente, es imprescindible completar el diagnóstico genético de la enfermedad con la caracterización del gen responsable de la enfermedad y de la mutación patogénica. Durante muchos años se ha discutido la necesidad o no de realizar el diagnóstico genético, pero hoy en día nadie lo discute, ya que confirma el diagnóstico, posibilita la detección de portadores y facilita el diagnóstico prenatal y el diagnóstico genético preimplantacional.

1.3.2 Disqueratosis Congénita (DC)

1.3.2.1 Aspectos generales

La DC es un síndrome de fallo medular congénito cuya base patológica se asocia a una alteración en el mantenimiento de la longitud telomérica (LT). Se caracteriza principalmente por alteraciones mucocutáneas conocidas como la triada clásica de leucoplasia oral, distrofia ungueal y alteración de la pigmentación ³⁸. Los pacientes con DC pueden asociar a las alteraciones cutáneas una combinación de fallo medular, fibrosis pulmonar, enfermedad hepática o carcinomas escamosos de cabeza y cuello ³⁹.

1.3.2.2 Aspectos clínicos

Los signos clínicos típicos de DC son las anomalías en la pigmentación cutánea, distrofia ungueal y leucoplaquia oral, lo que constituye la triada clásica descrita inicialmente por Zinnser en 1906 y reconocida posteriormente como una entidad clínica por Engman y Cole. Sin embargo, estas características no están presentes en todos los individuos, pudiendo aparecer o no a lo largo del curso de la enfermedad ⁴⁰. Las manifestaciones de DC no progresan siguiendo un patrón predecible ya que el tiempo de aparición de estos problemas varían entre individuos, incluso dentro de una misma familia. Así mismo la DC se caracteriza por tener un espectro clínico muy variable, abarcando tanto individuos que desarrollan un fallo medular en los primeros años de vida como aquellos que acaban desarrollando alteraciones hematológicas en la edad adulta sin anomalías físicas previas.

Además de las manifestaciones cutáneas, el espectro clínico asocia alteraciones a nivel de la médula ósea, pulmón e hígado. Estas alteraciones funcionales vienen determinadas por la sustitución de grasa o tejido fibrótico en dichos órganos, afectándolos de forma única o múltiple y de gravedad variable.

Se estima que el fallo de médula ósea (FMO) está presente en el 80% de los pacientes antes de los 30 años, existiendo una gran variabilidad entre el tipo y la gravedad del mismo en los distintos pacientes afectados. La alteración hematológica inicial más frecuente es la anemia macrocítica o la trombocitopenia, que puede evolucionar posteriormente a pancitopenia.

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) representa el 65% de la patología pulmonar en los pacientes que desarrollan alguna telomeropatía. La edad de presentación de la FPI se encuentra entre los 40-50 años, siendo la causa más frecuente de muerte en el paciente adulto. La FPI se caracteriza por pérdida del epitelio pulmonar, fibrosis prominente y alteración en el intercambio gaseoso ⁴¹.

También se han descrito complicaciones hepáticas que pueden mostrar diversas características histológicas como necrosis, fibrosis, cirrosis, inflamación e hiperplasia, aunque las lesiones hepáticas no son una complicación frecuente en DC ya que constituyen aproximadamente el 7% de las características clínicas. El resto de características clínicas que pueden darse en la DC se detallan en la tabla 1.4.

ÓRGANO	CARACTERÍSTICA
Crecimiento	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Estatura baja ❖ Crecimiento intrauterino retardado
Cabeza y cuello	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Microcefalia ❖ Leucoplasia conjuntival ❖ Conjuntivitis ❖ Blefaritis ❖ Estrabismo ❖ Catarata ❖ Obstrucción lacrimal ❖ Leucoplasia oral (70% pacientes varones)
Respiratorio	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Fibrosis pulmonar ❖ Enfermedad pulmonar restrictiva ❖ Reducción de la capacidad de difusión
Abdominal	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Cirrosis hepática ❖ Estenosis esofágica ❖ Leucoplasia mucosa anal
Genitourinario	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Hipospadia ❖ Fimosis ❖ Hipoplasia testicular ❖ Criptorquidia ❖ Riñón en herradura ❖ Estenosis ureteral
Esquelético	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Osteoporosis
Piel, uñas y pelo	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Pigmentación reticulada predominante en cara, cuello, espalda y brazos (94%) ❖ Hiperhidrosis ❖ Atrofia cutánea ❖ Distrofia ungueal (92%), pudiendo llegar a la pérdida completa de la misma ❖ Pestañas escasas ❖ Pelo ralo o escaso
Neurológico	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Retraso del desarrollo (25%) ❖ Dificultades en el aprendizaje ❖ Retraso mental ❖ Ataxia o hipoplasia cerebelar
Hematológico	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Fallo medular (desde citopenia aislada a pancitopenia grave) ❖ Mielodisplasia
Inmunológico	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Inmunodeficiencia ❖ Infecciones oportunistas
Neoplasias	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Carcinoma escamoso ❖ LMA ❖ Enfermedad de Hodgkin ❖ Carcinoma pancreático

Tabla 1.4: Espectro clínico en el paciente con Disqueratosis Congénita

1.3.2.3 Aspectos genéticos y moleculares

Como se ha comentado, la DC es una enfermedad asociada a defectos en el mantenimiento de los telómeros, que tienen la función de proteger y estabilizar el genoma. Los telómeros son hexanucleótidos (TTAGGG) repetidos en tándem, que se localizan en el extremo final del cromosoma. La mayoría del ADN telomérico está constituida por una doble cadena de ADN, sin embargo, el extremo distal forma un bucle en forma de T de cadena sencilla, lo que se denomina “T-loop”. Los telómeros están sujetos a un complejo de seis proteínas llamado shelterina o complejo protector, compuesto por TRF1 y TRF2 que a su vez interactúan con RAP1, TIN2, TPP1 y POT1 para asociarse al ADN telomérico de doble y simple cadena. La shelterina actúa en la regulación de la actividad de la holoenzima telomerasa, cuya acción principal es la extensión de los telómeros ⁴².

La ADN polimerasa solo es capaz de sintetizar ADN en sentido 5'-3', por lo que en el extremo telomérico esta enzima permite la replicación de una sola hebra de ADN, lo que implica que en cada división celular los telómeros se acortan. La telomerasa, que actúa como transcriptasa inversa, tiene la capacidad de sintetizar ADN en sentido 3'-5', asegurando la LT mediante la adición de secuencias nucleotídicas. El complejo telomerasa está compuesto por un ARN que actúa como molde para la adición de la secuencia corta repetitiva (TTAGGG) en el extremo 3' del ADN telomérico, denominado TERC. Así mismo se compone por la subunidad catalítica TERT, un componente de ARN, y proteínas accesorias específicas. Entre ellas se incluye la disquerina, que se trata de un heterodímero compuesto por NHP2 y NOP10, necesario para la estabilidad y la acumulación in vivo del ARN de la telomerasa humana (Imagen 1.2).

Sin embargo, a pesar de la función del complejo telomerasa, el extremo cromosómico no puede ser reparado completamente, existiendo un acortamiento progresivo con cada división celular. Cuando esta longitud se acorta de forma crítica, las células entran en estado de senescencia y posterior apoptosis.

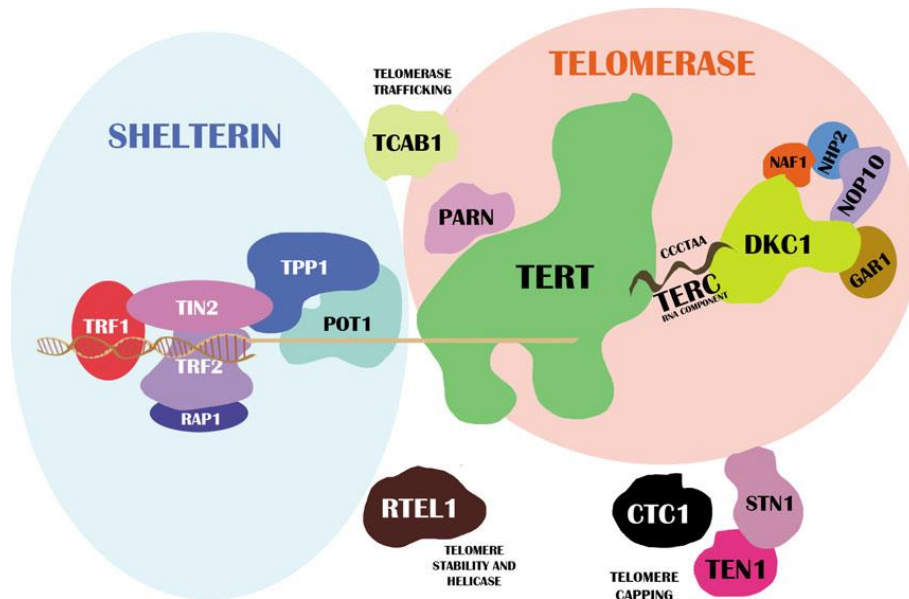


Imagen 1.2: Proteínas implicadas en el desarrollo de DC.

Esquema de las proteínas implicadas en el funcionamiento del complejo telomerasa y shelterina. Modificado de Wegman-Ostrosky y Savage. *British Journal of Haematology*, 2017, 177, 526–542.

Los pacientes con DC, presentan mutaciones en genes que codifican para el complejo telomerasa y para el complejo protector o shelterina. La presentación más frecuente de la enfermedad es la producida por mutaciones en el gen *DKC1*, que codifica para la proteína disquerina, y es de herencia ligada al cromosoma X. Este gen fue descrito en 1998²⁸, asociándose en ese momento la DC con una alteración en la función telomérica⁴³.

Sin embargo, en los últimos años se han ido describiendo mutaciones en otros genes implicados en la codificación de proteínas del complejo telomerasa o complejo protector. Antes de la llegada de las técnicas de secuenciación masiva (del inglés, *Next Generation Sequencing*, NGS), se utilizaron múltiples métodos para intentar caracterizar nuevos genes asociados a DC. De esta forma se secuenciaron todos aquellos genes que se consideraban candidatos como *TERC*, *TERT*, *NOP10*, *NHP2* y *WRAP53*, llegando a identificarse variantes patogénicas en los mismos como causantes de DC^{44 45 46 47 48}. Más

tarde, la combinación de fenotipos clínicos característicos y una medición de LT menor que el primer percentil para la edad en una familia con DC fue esencial para el descubrimiento de *TINF2* como causa de DC de herencia autosómica dominante ⁴⁹.

Desde 2013, la secuenciación masiva del exoma (del inglés “*whole exome sequencing*”, WES) se ha utilizado con éxito para identificar las causas genéticas de la DC en varios estudios. CTC1, una proteína que limita los telómeros, se identificó como una causa de Coats plus ⁵⁰; la asociación con telómeros muy cortos llevó a la conclusión de que Coats plus y DC estaban clínicamente relacionados ⁵¹.

En los últimos años se han identificado variantes patógenas asociadas al desarrollo de DC en *RTEL1*, *ACD*, *POT1*, *PARN*, *NAF1* y *STN1*; uniéndose de esta forma al grupo de genes asociados a alteración telomérica ^{52 53 54 55 56 57 58 59 60}. Gracias al descubrimiento de todos estos genes, actualmente la causa genética de la DC se puede identificar hasta en aproximadamente el 70% de los pacientes ^{61 62}. Actualmente se conocen un total de 14 genes asociados a la enfermedad (tabla 1.5).

Debido a este trastorno genético subyacente, la capacidad de las células para extender los telómeros se ve limitada. Esto provoca un acortamiento crítico de los telómeros que resulta en la pérdida de los mismos, con la consecuente apoptosis o muerte celular precoz. En definitiva, las células del paciente con DC pierden la capacidad de replicarse antes de lo que cabría esperar para su edad ⁶².

GENES	OMIM	LOCALIZACIÓN	HERENCIA	FRECUENCIA (%)
<i>DKC1</i>	300126	Xq28	XLR	30
<i>TINF2</i>	604319	1q11.2	AD	11-20
<i>TERT</i>	187270	5p15.33	AD, AR	5
<i>TERC</i>	602322	3q26.2	AD	5
<i>RTEL1</i>	608833	20q13.33	AD, AR	5-10
<i>ACD</i>	609377	16q22.1	AD, AR	<1
<i>CTC1</i>	613129	17p13.1	AD	<1
<i>NOP10</i>	606471	4q31.2	AR	<1
<i>NHP2</i>	606470	5q35.3	AR	<1
<i>PARN</i>	604212	16p13.1	AR	<1
<i>WRAP53</i>	612661	17p13.1	AR	<1
<i>POT1</i>	606478	7q31	AD	?

Tabla 1.5: Características genéticas de la Disqueratosis congénita.

1.3.2.4 El diagnóstico en Disqueratosis Congénita

El diagnóstico clínico de DC se basa en la presencia de las cuatro características principales de la enfermedad, que incluyen la tríada mucocutánea y el FMO, así como la presencia de características multisistémicas de la enfermedad y hallazgos de laboratorio compatibles (tabla 1.6). Para hacer un diagnóstico clínico correcto de DC se requieren al menos dos de las cuatro características principales y dos características multisistémicas. Generalmente, los pacientes de edad pediátrica a menudo presentan la enfermedad como un trastorno multisistémico, mientras que en los pacientes adultos las características fenotípicas son muy variables, sin asociar necesariamente las características clásicas de DC. En aquellos pacientes con sospecha clínica de DC, es fundamental el estudio de la LT, que demuestra un telómero significativamente más corto ($< 1-10$ percentil) que la medida para la edad del paciente. Entre los métodos más utilizados para medir la LT, se encuentran el Southernblot, PCR (del inglés, *polymerase chain reaction*) y FISH (del inglés, *fluorescent in situ hybridization*). La utilización de FISH para medir la LT en los linfocitos parece ser la técnica más sensible y específica⁶³. Sin embargo, a pesar de lo expuesto anteriormente, el diagnóstico definitivo proviene de la identificación del gen mutado.

Sangre periférica	Citopenia de una o dos líneas celulares (80%)
	Macrocitosis con o sin anemia
	Trombocitopenia
	Reticulocitos descendidos
	Niveles elevados de HbF
	Factor Von Willebrand elevado
Examen médula ósea	Hipocelularidad
	Incremento de mastocitos
	Diseritropoyesis
	SMD/LMA
Alteraciones inmunológicas	Anormalidades humorales: Hipo/hipergammaglobulinemia
	Anomalías celulares: Linfopenia B, T y NK
	Anomalías en la función: Reducida la proliferación, Incremento de la apoptosis, Anergia
Citogenéticas	Puentes cromosómicos, hipoploidia y micronucleolos
	Puentes en anafase y telofase
	Telómeros cortos con señal libre

Tabla 1.6: Hallazgos de laboratorio en pacientes con DC

1.3.3 Ribosomopatías

Los defectos en la transcripción del ADN ribosomal, en el ensamblaje de las subunidades ribosomales, o en su unión/transporte para generar el ribosoma son la causa de las enfermedades asociadas a la biosíntesis ribosomal. Los ribosomas están compuestos por las subunidades 40S y 60S. En el nucléolo, la asociación de las subunidades 40S y la 60S forman los ribosomas 80S, responsables de la traducción a proteínas del ARNm (Imagen 1.3). Se estima que 80 proteínas ribosomales y al menos 200 factores accesorios contribuyen a la biogénesis de los ribosomas.

Las variantes patogénicas en los genes esenciales para la biogénesis y el procesamiento ribosomal, se asocian con ABD y SSD. Estos síndromes tienen en común que son trastornos en la biología ribosomal, sin embargo, existen diferencias fisiológicas y clínicas entre ambos síndromes que merecen consideración.

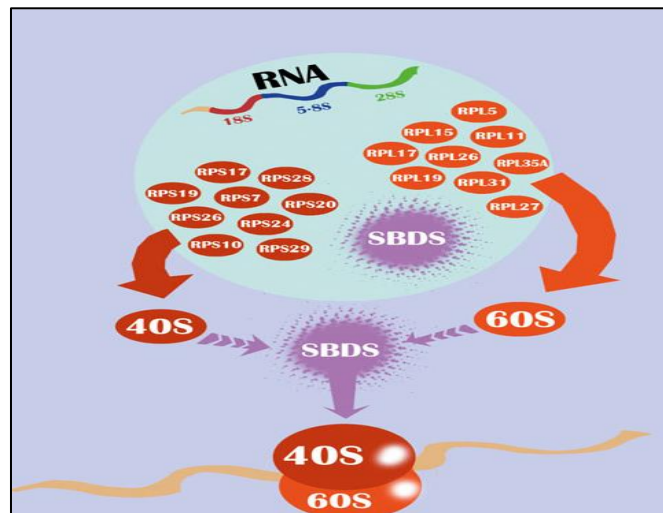


Imagen 1.3: La biogénesis del ribosoma en ABD SSD. Las proteínas asociadas a ABD se encuentran tanto en la subunidad ribosomal 40S como en la 60S. Están codificados por RPS19, RPS24, RPS1, RPS15, RPS27A, RPS10, RPS29 y RPS26, que pertenecen a la subunidad ribosomal 40S, y por RPL5, RPL11, RPL35A, RPL15 y RPL36, que son componentes de la subunidad ribosomal 60S. La proteína SBDS parece estar involucrada en la unión de las subunidades ribosómicas 40S y 60S para formar el ribosoma 80S maduro. TSR2 y GATA1 no se muestran, pero también están asociados con trastornos ribosómicos. Modificado de Wegman-Ostrosky y Savage. *British Journal of Haematology*, 2017, 177, 526–542.

1.3.3.1 Síndrome de Shwachman Diamond (SSD)

1.3.3.1.1 Aspectos generales

El SSD es una enfermedad congénita multisistémica que se origina como consecuencias de defectos en la transcripción del ARN ribosomal. Se caracteriza principalmente por insuficiencia pancreática exocrina, hematopoyesis alterada y predisposición a leucemia, habiendo sido descrita por primera vez en 1964 por Shwachman, Diamond, Oski y Khaw⁶⁴.

1.3.3.1.2 Aspectos clínicos

Las características clínicas básicas se podrían clasificar en tres grupos: hematológicas, gastrointestinales y esqueléticas (Tabla 1.7).

Hematológicos	Gastrointestinales	Esqueléticas
<ul style="list-style-type: none"> • Neutropenia grave • Anemia • Trombocitopenia 	<ul style="list-style-type: none"> • Insuficiencia pancreática exocrina • Aumento enzimas hepáticas • Lipomatosis pancreática • Malabsorción de grasas • Esteatorrea 	<ul style="list-style-type: none"> • Disostosis metafisaria • Talla baja • Anomalías costales

Tabla 1.7: Alteraciones clínicas en los pacientes afectados de SSD

1.3.3.1.2.1 Alteraciones hematológicas

En cuanto a las alteraciones hematológicas, la citopenia más frecuente en el SSD es la neutropenia, definida como un recuento de neutrófilos $<1.5 \times 10^9/L$, que afecta al 88-100% de los pacientes. En algunos enfermos se han detectado además alteraciones en la quimiotaxis. Aproximadamente un tercio de los pacientes tienen neutropenia crónica y en los dos tercios restantes la neutropenia es intermitente. La anemia se ha descrito en el 42-82% de los pacientes, ya sea normocítica o macrocítica, con reticulocitopenia. La trombocitopenia, definida como un recuento de plaquetas $<150 \times 10^9/L$, se ha descrito en el 24%-88% de los pacientes y generalmente no se asocia a neutropenia. En alrededor del 80% de los pacientes con SSD, se han descrito niveles elevados de HbF, probablemente como indicador de estrés medular. Aproximadamente el 10-65% de los pacientes desarrolla pancitopenia, desembocando en algunos casos en AM grave⁶⁵.

1.3.3.1.2.2 Alteraciones gastrointestinales

Entre las alteraciones gastrointestinales, una de las características distintivas del SSD es la disfunción pancreática exocrina, de gravedad variable, causada por la ausencia de células acinares. En la primera infancia los pacientes se presentan clásicamente con malabsorción, esteatorrea, falta de crecimiento y niveles bajos de vitaminas liposolubles A, D, E y K. Los niveles bajos de tripsinógeno pancreático e isoamilasa sérica, son marcadores útiles para la insuficiencia pancreática en pacientes con SSD, sin embargo, la edad del paciente es importante en la interpretación. El tripsinógeno es generalmente bajo en pacientes con SSD menores de 3 años de edad, pero aumenta hasta el rango normal en pacientes mayores, donde se vuelve menos útil como marcador de enfermedad. Los niveles séricos de isoamilasa son bajos en pacientes con SSD de todas las edades, sin embargo, la utilidad de esta prueba en pacientes menores de 3 años es limitada, ya que los niveles de isoamilasa también son bajos en niños sanos de esta edad. También puede ser útil la medición de la elastasa fecal. Por razones que no están claras, la función pancreática exocrina mejora espontáneamente con el tiempo en aproximadamente el 50% de los pacientes. La hepatomegalia se encuentra en aproximadamente el 15% de los pacientes, y el 50%-75% de los pacientes tendrán enzimas hepáticas elevadas entre 2-3 veces por encima del límite de la normalidad⁶⁶.

1.3.3.1.2.3 Alteraciones esqueléticas

Muchos pacientes presentan alteraciones esqueléticas. Los defectos esqueléticos están relacionados con el desarrollo anormal de las placas de crecimiento. La disostosis metafisaria se ha reportado en el 50% de los pacientes, suele ser asintomática y generalmente implica la cabeza femoral. Las anomalías de la caja torácica se encuentran en el 30-50%. El retraso del crecimiento es frecuente, y no parece asociarse a malnutrición.

Además de lo descrito anteriormente, cabe destacar que al igual que otros síndromes de fallo medular congénito, los pacientes con SSD tienen un mayor riesgo de SMD y LMA. Se ha descrito que el riesgo estimado de desarrollar SMD a los 20 años es del 19% y del 36% de desarrollar LMA a los 30 años⁶⁷. Las alteraciones citogenéticas han sido detectadas en alrededor del 30% de los pacientes. De ellas, las anormalidades del cromosoma 7 son las más frecuentes. En los pacientes con SSD no se han descrito tumores sólidos.

1.3.3.1.3 Aspectos genéticos y moleculares

El SSD es un trastorno autosómico recesivo en el que la mayoría de los pacientes que cumplen los criterios diagnósticos clínicos son dobles heterocigotos con afectación del gen *SBDS*, localizado en el cromosoma 7q11⁶⁸. Este gen codifica la proteína SBDS humana, que se expresa en una gran variedad de tejidos y está particularmente concentrada en el nucléolo celular, donde tiene lugar la biogénesis ribosomal.

En el contexto del SSD, el mal funcionamiento de la proteína SBDS, implica alteraciones importantes en la biogénesis ribosomal y en la estabilidad del huso mitótico⁶⁹, afectando a la proliferación y formación de colonias hematopoyéticas⁷⁰.

Se postula que la proteína SBDS podría tener la función de ayudar en la unión de la subunidad ribosómica 60S a la subunidad 40S para luego permitir la síntesis de proteínas⁷¹. En células de pacientes con SSD se ha evidenciado que existe una expresión anómala de genes implicados en la biogénesis del ribosoma, concretamente en el procesamiento del ARNr. Además, se objetivó un descenso de la expresión de varias proteínas codificadas por genes implicados en el crecimiento celular (*RPS9*, *RPS20*, *RPL6*, *RPL15*, *RPL22*, *RPL23* y *RPL29*). Así mismo, se cree que dicha proteína está

relacionada con otras funciones adicionales de la médula ósea, como la función que ejerce el microambiente medular, la proliferación celular y la mitosis⁷².

Podemos poner como ejemplo de ello los modelos murinos estudiados por Zhang en 2006, en los que la alteración de la proteína SBDS dio como resultado una letalidad embrionaria temprana⁷³. Así mismo, el estudio realizado por Raaijmakers en 2010 demostró que la eliminación selectiva de SBDS en células osteoprogenitoras de ratón, daba lugar a leucopenia y linfopenia, así como displasias de los neutrófilos y megacariocitos⁷⁴.

Como ya hemos comentado, la proteína SBDS actúa durante la formación del huso mitótico confiriendo estabilidad cromosómica. De esta forma, el mal funcionamiento de la proteína SBDS podría conferir una cierta inestabilidad del huso mitótico. Se ha demostrado que en las células de pacientes afectados parece haber un aumento de aberraciones como husos mitóticos multipolares y amplificación centrosomal. Este hecho podría contribuir a los mecanismos de fracaso medular y leucemogénesis, características clásicas de los pacientes con SSD⁷⁵.

1.3.3.1.4 El diagnóstico en SSD

El diagnóstico de SSD se basa en gran medida en el fenotipo clínico, incluyendo la disfunción pancreática exocrina y la alteración de la función medular como características principales. Sin embargo, existe una considerable variabilidad fenotípica entre los individuos e incluso dentro del mismo individuo a través del tiempo, lo que dificulta el diagnóstico particularmente en pacientes mayores, donde síntomas como la esteatorrea pueden haberse resuelto o la neutropenia puede ser leve e intermitente.

En esos casos, es fundamental identificar las posibles variantes patogénicas en los genes asociados al desarrollo de la enfermedad, ya que sirve para corroborar los datos clínicos e identificar familiares afectados. Cerca del 90% de los individuos afectados portan una de tres variantes de *SBDS* patogénicas en un alelo del exón 2: 183_184TA>CT, 258+2T>C, o la combinación de 183_184TA>CT + 258+2T>C. La mutación 258+2T>C afecta a la región de *splicing* del intrón 2, mientras que la alteración del dinucleótido, 183_184TA/CT, introduce un codón de *stop* (K62X). Estas mutaciones patogénicas

surgen como consecuencia de la conversión génica debido a la combinación entre el gen *SBDS* y su pseudogen⁷⁶.

No obstante, sigue habiendo un porcentaje de pacientes clínicamente compatibles con SSD en los que no se detecta mutación patogénica en este gen. Por ello, varios grupos internacionales están intentando avanzar en la identificación de nuevos genes que puedan ser responsables de esta patología. Son claros ejemplos los recientes descubrimientos de genes como *DNAJC21*^{77 78} y *EFLI*⁷⁹.

1.3.3.2 Anemia de Blackfan-Diamond (ABD)

1.3.3.2.1 Aspectos generales

La anemia de Blackfan-Diamond fue descrita en 1938 por Diamond y Blackfan⁸⁰. Esta anemia de origen congénito se caracteriza por un fallo en la producción de células eritroides, y se estima que su incidencia es de 5-7 casos por millón de nacimientos vivos⁸¹⁸²⁸³. A este fallo de origen central se le suman diferentes anomalías congénitas y predisposición a cáncer.

1.3.3.2.2 Aspectos clínicos

La forma clásica de presentación se caracteriza por una anemia usualmente macrocítica, en ocasiones normocítica, con reticulocitopenia. Suele ser de aparición precoz, presentándose usualmente en niños por debajo del año. En el 92% de los casos, los pacientes son diagnosticados durante el primer año de vida, el 75% a los 6 meses y hasta un 50% en los 3 primeros meses, según el registro norteamericano⁸⁴. Aun así, existen casos en los que el diagnóstico se ha realizado en la edad adulta⁸⁵. La macrocitosis es evidente en la mayoría de los casos, sin embargo, hay pacientes en los que pudiera estar enmascarada por déficit de hierro o incluso por un rasgo talasémico.

Esta anemia se acompaña de cifras normales de leucocitos y plaquetas y una médula ósea normocelular caracterizada por presentar un déficit selectivo de precursores eritroides. Así mismo, los pacientes afectados de ABD presentan niveles elevados de HbF y adenosin desaminasa eritrocitaria (ADAe). ADAe se trata de una enzima crítica en el metabolismo de las purinas que frecuentemente se encuentra elevada en aproximadamente el 80-85% de los pacientes afectados de ABD⁸⁶

A diferencia de otros SFMC en los que la citopenia puede progresar a otras formas más graves de fallo medular, en la ABD la progresión es menos clara, de hecho hasta un 20% de los pacientes pueden desarrollar remisiones espontáneas de la enfermedad o inducidas por el tratamiento⁸⁴. La remisión espontánea de la enfermedad ha sido descrita incluso en pacientes que llevaban años recibiendo corticoides y que tenían dependencia transfusional.

Aparte de la manifestación hematológica, cerca del 50% de los pacientes con ABD asocian malformaciones congénitas y de estos, hasta un 25% pueden presentar más de una ⁸⁷. Las alteraciones craneoencefálicas que afectan a la línea media, las alteraciones renales, las malformaciones cardíacas y las alteraciones en el pulgar son las más frecuentes. La talla baja forma parte de la ABD en el 30% de los pacientes y puede asociarse con otras alteraciones congénitas, además de la consecuencia de la administración de corticoides. En la tabla 1.8 se detallan las malformaciones congénitas más frecuentes en ABD.

Los pacientes con ABD también poseen predisposición para el desarrollo de cáncer, principalmente SMD y LMA, siendo el riesgo de LMA a lo largo de la vida del 25%. Sin embargo estos pacientes no solo tienen predisposición a padecer cáncer de origen hematológico, los tumores sólidos también son frecuentes en esta patología, principalmente osteosarcoma y linfoma de Hodgkin⁸⁸.

ÓRGANO/SISTEMA	ANOMALÍA
Craneofacial	Hipertelorismo, labio y/o paladar hendido, paladar arqueado, microcefalia, micrognatia, microtia, orejas de implantación baja, epicanto, ptosis
Oftalmológico	Glaucoma congénito, estrabismo, catarata congénita
Cuello	Cuello corto, deformidad de Sprengel, deformidad de Klippel-Feil
Musculoesquelético	Estatura baja, anomalías en pulgares (hipoplásico, bífido, trifalángicos), eminencia tenar plana
Urogenital	Agenesia renal, riñón en herradura, sistemas colectores duplicados, hipospadias
Cardíaco	Comunicación interventricular, comunicación interauricular, coartación de la aorta, foramen oval permeable, tetralogía de Fallot, anomalías cardíacas complejas

Tabla 1.8: Malformaciones congénitas más frecuentes en pacientes con ABD

1.3.3.2.3 Aspectos genéticos y moleculares

La ABD se trata de un síndrome de origen genético en el que la mayor parte de los pacientes poseen mutaciones esporádicas. En aquellos casos en los que se produce la herencia de la mutación, esta es principalmente autosómica dominante. Sin embargo, también se han descrito familias en las que los estudios de segregación sugerían patrones de herencia autosómica recesiva^{89 90 90}. Por tanto, podría decirse que esta enfermedad presenta un patrón de herencia mixta.

Es conocido que la causa primaria del desarrollo de esta enfermedad es la presencia de variantes patogénicas en genes que codifican para la elaboración de componentes de las subunidades ribosómicas 40S o 60S. Este vínculo con la fisiología del ribosoma se estableció en 1999 con el descubrimiento de mutaciones en *RPS19*, gen que codifica la proteína ribosómica RPS19. Este gen sigue siendo la causa genética conocida más común de ABD hasta la fecha representando aproximadamente el 25% de los casos⁷.

Posteriormente, en 2010, se describieron cinco genes que codifican para la subunidad 40S (*RPS17*, *RPS24*, *RPS10*, *RPS7* y *RPS26*) y tres para la subunidad 60S (*RPL35A*, *RPL5* y *RPL11*). Todos ellos asociados a la enfermedad y con patrón de herencia autosómica dominante⁸⁸. Más tarde fueron los estudios en CGH array los que han llevado al descubrimiento de deleciones en varios de estos genes y en nuevos genes candidatos como *RPL26* y *RPL15*^{91 92}. Las variantes patogénicas en *GATA1* asociadas a ABD, fueron detectadas a través de estudios de WES. *GATA1* es un factor de transcripción a nivel hematopoyético y que presenta una herencia ligada al X⁹³.

Más recientemente, también se descubrieron variantes patogénicas asociadas a la enfermedad en *RPS29*, *RPS28*, *RPL31*, *RPL27* y *TSR2*, este último con herencia ligada al cromosoma X^{94 95 96}.

El mecanismo exacto por el cual las mutaciones en proteínas ribosomales pueden producir una anemia tan profunda como la que se ve en ABD no ha sido completamente dilucidado. De hecho, la asociación de la ABD con un defecto en la biogénesis de los ribosomas tardó años en reconocerse como tal, ya que resultaba sorprendente que una enfermedad que se manifiesta fundamentalmente en la serie eritroide pudiera tener su

origen en un mecanismo tan importante para todas las células. Es plausible que debido a que las células eritroides maduras carecen de núcleo, las células eritroides inmaduras requieren altas tasas de síntesis de ribosomas para producir suficientes ribosomas para todo el ciclo de vida de los eritrocitos, y las mutaciones asociadas a ABD limitan esta tasa de síntesis ⁹⁶. Por otro lado, la observación del fenotipo en modelos de ratón, sugirió que la estabilización y/o la activación de p53 podría jugar un papel importante en el desarrollo de la enfermedad, ya que podría estar implicada en el fenotipo pro-apoptótico de células con haploinsuficiencia en proteínas ribosomales ⁸⁸. Estos modelos sugirieron que la disminución en la síntesis de proteínas ribosomales activaría p53 induciendo eventos posteriores que conllevarían la parada de ciclo y apoptosis. En el caso de la ABD, esto conduciría al fenotipo anémico, así como a problemas de crecimiento y malformaciones congénitas.

1.3.3.2.4 El diagnóstico en ABD

El signo guía para el diagnóstico de la enfermedad es la anemia macrocítica con eritroblastopenia. Esta anemia suele ser grave y persistente. El estudio medular muestra una celularidad normal o levemente disminuida, con eritroblastopenia y precursores mieloides y megacariocíticos dentro de la normalidad.

Por otra parte, hasta un 85% de los pacientes pueden tener niveles de ADAe elevados, apoyando de esta forma el diagnóstico. Sin embargo, una actividad normal de esta enzima no lo excluye. Es importante destacar que para evitar falsos negativos los niveles de ADAe deben realizarse antes de la primera transfusión o al menos 3 meses después de la última.

De igual forma que en otros SFMC, los niveles de hemoglobina fetal están aumentados, ya que es indicador de estrés medular. La historia familiar y la presencia de malformaciones asociadas a ABD, apoyarían el diagnóstico.

No obstante, a pesar de lo expuesto anteriormente, el diagnóstico definitivo viene de la mano de la detección de variantes patogénicas en alguno de los genes que han sido relacionados con ABD. Tras el descubrimiento del primer gen implicado en el 25% de los casos, el *RPS19*, se han descrito otros 19 genes asociados a la enfermedad (tabla 1.9). La mayoría de las alteraciones genéticas se deben a mutaciones puntuales y pequeñas

inserciones y deleciones⁹¹. En el 5-20% de los casos son consecuencia de grandes deleciones o reordenamientos que no se detectan por secuenciación, lo que haría necesaria la aplicación de otras técnicas de detección genética como MLPA (del inglés, *multiplex ligation-dependent probe amplification*) o CGH array (del inglés, *comparative genomic hybridization*)⁹⁷.

GENES	OMIM	LOCALIZACIÓN	HERENCIA	FRECUENCIA (%)
<i>RPS19</i>	603474	19q13.2	AD	25
<i>RPS24</i>	602412	10q22.3	AD	2-4
<i>RPS17</i>	612527	15q25.2	AD	1
<i>RPL35A</i>	180468	3q29	AD	2-4
<i>RPL5</i>	603634	1p22.1	AD	7
<i>RPL11</i>	604175	1p36.11	AD	5
<i>RPS7</i>	603658	2p25.3	AD	<1
<i>RPS10</i>	603632	6p21.31	AD	3-6
<i>RPS26</i>	603701	12q13.2	AD	3-6
<i>RPL26</i>	603704	17p13.1	AD	<1
<i>RPL15</i>	604174	3p24.2	AD	1 caso aislado
<i>RPS29</i>	603633	14q21.3	AD	<1
<i>RPL31</i>	617415	2q11.2	AD	1 caso aislado
<i>GATA1</i>	305371	Xp11.23	LX	<1
<i>RPL19</i>	180466	17q12	AD	<1
<i>RPL27</i>	607526	17q21.31	AD	1 caso aislado
<i>RPS27</i>	603702	1q21.3	AD	1 caso aislado
<i>RPS28</i>	603685	19p13.2	AD	2 casos aislados
<i>RPS15A</i>	603674	16p12.3	AD	<1
<i>TSR2</i>	300945	Xp11.2	LX	<1

Tabla 1.9: Genes asociados al desarrollo de ABD

1.3.4 Trombopenia Amegacariocítica Congénita (TAC)

La TAC se trata de un trastorno que se presenta al nacimiento y se caracteriza por trombocitopenia generalmente inferior a $50 \times 10^9/L$ y ausencia/disminución de megacariocitos en médula ósea, sin asociar malformaciones congénitas⁹⁸. Sin embargo, a lo largo del tiempo y de forma progresiva, la hipocelularidad va aumentando e implica a las demás series hematopoyéticas. Así, puede derivar en el desarrollo de aplasia medular en hasta el 40% de los casos a los 10 años e incluso evolucionar a LMA/SMD.

Este síndrome se ha asociado a mutaciones en el gen que codifica para el receptor de la trombopoyetina *cMPL*. El mecanismo de herencia es AR y se han descrito pacientes con mutaciones en *cMPL* en homocigosis y heterocigosis compuesta⁹⁹.

El diagnóstico puede realizarse en las primeras semanas de vida, como consecuencia de aparición de petequias y sangrado por trombocitopenia grave¹⁰⁰. En 2005 se propuso una clasificación en función del curso clínico y de la afectación funcional del gen. En esta clasificación se contemplan 3 tipos de TAC¹⁰¹:

- ❖ Tipo I: pancitopenia severa de inicio en las primeras semanas de vida, con ausencia de megacariocitos y recuentos plaquetarios inferiores a $20 \times 10^9/L$. En este grupo hay una pérdida completa de la funcionalidad del gen.
- ❖ Tipo II: se trata de una forma más leve con aumentos transitorios de los recuentos de plaquetas hasta valores casi normales durante el primer año de vida y un inicio de insuficiencia medular a los 3 a 6 años de edad o más. En este grupo, hay receptores parcialmente funcionales para el gen *cMPL*.
- ❖ Tipo III: existe una megacariopoyesis ineficaz sin defectos en el gen *cMPL*.

1.3.5 Neutropenia Congénita Grave (NCG)

Se trata de un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por neutropenia crónica grave, infecciones piógenas y bloqueo de la maduración de las células de la médula ósea. Tiene una prevalencia de 1-1,7/333.300 habitantes y una incidencia anual de 1/250.000 nacimientos¹⁰².

Los pacientes no tienen rasgos clínicos característicos, a excepción de una neutropenia generalmente inferior a $0.5 \times 10^9/L$. La enfermedad puede progresar a SMD y LMA, pudiendo aparecer durante su evolución monosomía del cromosoma 7, trisomía 21, mutaciones del receptor de G-CSF y del oncogen RAS¹⁰³.

El diagnóstico suele realizarse en la infancia, demostrando neutropenia severa en al menos 3 recuentos hematológicos separados entre sí más de un mes, con el objetivo de diferenciarla de la neutropenia cíclica. Esta patología tiene una base genética en la que el gen más comúnmente afectado es *ELANE*, que se detecta en alrededor del 30% de los pacientes¹⁰⁴.

Sin embargo, se han ido describiendo otros genes asociados a neutropenia congénita que siguen diferentes patrones de herencia. En concreto, se han descrito más de 20 genes asociados a neutropenia congénita en los últimos 10 años, habiendo sido descritos 5 de ellos en los últimos 3. En la tabla 1.10 se relacionan los genes más frecuentemente mutados en la neutropenia congénita.

GEN	OMIM	HERENCIA	LOCALIZACIÓN
<i>CSF3R</i>	138971	AD	1p35-p34.3
<i>ELANE/ELA2</i>	130130	AD	19p13.3
<i>GFII</i>	600871	AD	1p22
<i>HAX1</i>	605998	AR	1q21.3
<i>G6PC3</i>	611045	AR	17q21.31
<i>WAS/SCNX</i>	300392	XLR	Xp11.33-11.22
<i>CXCR2</i>	146928	¿	2q35
<i>JAGN1</i>	616012	AR	3p25.3
<i>TCIRG-1</i>	604592	AR	11q13.2
<i>VPS45</i>	610035	AR	1q21.2
<i>CLPB</i>	616254	AR	11q13.4

Tabla 1.10: Genes asociados a neutropenia congénita

1.3.6 Otros síndromes que asocian fallo medular

Como se ha comentado anteriormente, hay un elevado número de síndromes que pueden asociar fallo medular. La frecuencia de estos síndromes es muy baja, considerándose todos ellos dentro del grupo denominado como enfermedades raras. En la tabla 1.11 se describen las características básicas algunos de ellos.

SÍNDROMES DE FALLO MEDULAR	CARACTERÍSTICAS BÁSICAS
Trombopenia con ausencia de radio	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Herencia digénica ❖ Gen mayormente afecto <i>RBM8A</i> asociado a microdeleciones en el Chr 1q21.1 ❖ Ausencia de radio y pulgares malformados asociados a trombocitopenia ❖ Se han reportado casos asociados a leucemia
Hipoplasia pelo-cartílagos	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Herencia AR ❖ Gen mayormente afecto <i>RMRP</i> ❖ Displasia esquelética, talla baja, pelo hipoplásico, disfunción inmune y predisposición a cáncer
Síndrome Nijmegen	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Herencia AR ❖ Gen mayormente afecto <i>NBN</i> ❖ Defectos en los sistemas de reparación del daño al ADN ❖ Microcefalia, insuficiencia ovárica e infecciones de repetición ❖ Se asocia a inmunodeficiencias combinadas y predisposición tumoral de origen linfóide
Síndrome de Bloom	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Herencia AR ❖ Gen mayormente afecto <i>NBN</i> ❖ Defectos en la replicación y mecanismos de reparación del ADN ❖ Eritema teleangiectásico, fotosensibilidad, manchas café con leche, alteraciones esqueléticas y diabetes ❖ Se asocia a inmunodeficiencias y predisposición a leucemias y linfomas
Síndrome Seckel	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Herencia AR ❖ Gen mayormente afecto <i>SCKL1</i> ❖ Defectos en los sistemas de respuesta al daño de ADN ❖ Microcefalia, retraso mental y CIR ❖ Pueden desarrollar aplasia medular y/o LMA

Tabla 1.11: Algunos síndromes asociados a fallo medular y características asociadas

1.3.7 SFMC inclasificables o fenotípicamente indefinidos (SFMC-I)

Los SFMC generalmente pueden presentar características clínicas típicas que sugieren algún trastorno congénito. Sin embargo, también se dan casos de pacientes con alta sospecha de que padezcan algún SFMC pero que no puedan ser categorizados dentro de ningún síndrome concreto. Incluso no es infrecuente encontrar pacientes en los que las pruebas de laboratorio sean inconsistentes, pudiendo presentar por ejemplo una prueba de fragilidad cromosómica o longitud telomérica dentro de la normalidad. Estos pacientes son incluidos en el grupo de los denominados SFMC inclasificables o fenotípicamente indefinidos (SFMC-I).

No existen muchos datos publicados de forma aislada sobre este tipo de pacientes. Sin embargo, parece necesario profundizar un poco más en el conocimiento de los SFMC-I ya que la situación de estos pacientes suele derivar en la realización de múltiples estudios e investigaciones para alcanzar el diagnóstico, con el consecuente gasto de tiempo y recursos, retrasos en el diagnóstico definitivo, pacientes infradiagnosticados e incluso con indicaciones de tratamientos inadecuados.

Por estos motivos, en el año 2008 el grupo de Teo y colaboradores publica un trabajo en el que analizan pacientes con características de fallo medular congénito indefinidas con el objetivo de definirlos clínicamente y agruparlos para poder afinar el diagnóstico. Basado en esta idea, inicialmente establecen unos criterios para identificar de forma homogénea a este grupo tan heterogéneo de pacientes. Estos criterios se detallan a continuación en la tabla 1.12¹⁰⁵.

CRITERIOS PARA DEFINIR SÍNDROMES DE FALLO MEDULAR INCLASIFICABLES (CUMPLIR 1 Y 2)
CRITERIO 1: No cumple criterios para incluirse en ningún grupo de fallo medular categorizado
CRITERIO 2: Cumplir los criterios A y B A) Cumplir al menos dos de los criterios siguientes: <ul style="list-style-type: none"> ❖ Citopenias crónicas detectadas en al menos 2 ocasiones en los últimos 3 meses ❖ Disminución de progenitores en MO o evidencia de hematopoyesis ineficaz ❖ Hemoglobina F elevada para su edad ❖ Macrocitosis de serie roja (descartando hemólisis y déficits carenciales) B) Cumplir al menos uno de los criterios siguientes: <ul style="list-style-type: none"> ❖ Historia familiar de insuficiencia medular ❖ Presentación en edad menor a un año ❖ Anomalías físicas que sugieran trastorno congénito
Se excluyen pacientes con aplasia medular adquirida, SMD y/o LA.

Tabla 1.12: Criterios para definir los SFMC-I. Modificado de Teo JT, Klaassen R, Fernandez C V. *Pediatrics*. 2008;122(1):e139-e148. doi:10.1542/peds.2007-3415

Una vez establecidos estos criterios, consiguen seleccionar un total de 39 pacientes derivados del registro canadiense de fallo medular congénito que reúnen estas condiciones y los dividen en grupos en función de las características fenotípicas: pacientes con citopenia multilineal con y sin malformaciones físicas, anemia aislada con y sin malformaciones físicas, neutropenia aislada con y sin malformaciones físicas y trombocitopenia aislada con y sin malformaciones físicas.

Este trabajo concluye que la división en estos grupos de los SFMC-I no parece tener ventajas diagnósticas, ya que no refleja su utilidad para llegar al diagnóstico definitivo. Sin embargo, ya entonces inciden en la idea de que la estrategia más acertada sería desarrollar nuevas herramientas de diagnóstico genético que ayuden a detectar la alteración molecular subyacente y el consecuente diagnóstico definitivo. En la actualidad

ya es una realidad el hecho de que se pongan a disposición de los pacientes con SFMC-I tecnologías de alto rendimiento diagnóstico molecular.

Es el ejemplo del trabajo publicado por el grupo de Zhang¹⁰⁶, que estudia mediante un panel NGS de 85 genes un total de 71 pacientes afectados de fallo medular sin características clínicas típicas de ningún SFMC clásico. De forma más reciente también encontramos el ejemplo del grupo francés liderado por Soulier, en el que estudian un total de 179 muestras de pacientes con sospecha de SFMC¹⁰⁷. En este grupo fueron estudiados pacientes con sospecha de SFMC sin fenotipo clínico definido, excluyéndose aquéllos con características de AF, ABD, DC, SSD y NCG. A todos ellos se les realizó WES de ADN extraído de fibroblastos, por lo que todas las muestras correspondían a línea germinal. Todo parece indicar que las nuevas tecnologías NGS son una herramienta a tener muy en cuenta en pacientes sin características clínicas definidas.

1.4 El proceso diagnóstico en los SFMC

1.4.1 Importancia del diagnóstico en los SFMC

El reconocimiento precoz de los SFMC es esencial a la hora de la toma de decisiones con respecto al manejo clínico y la elección del tratamiento más adecuado. Una evaluación cuidadosa puede aportar datos importantes en el momento del diagnóstico de estos síndromes. Sin embargo, son los conocimientos sobre las vías moleculares subyacentes a estos trastornos los que han aportado mayor conocimiento en relación a los mecanismos globales que contribuyen a la insuficiencia medular y la transformación maligna.

Realizar un adecuado diagnóstico en los SFMC tiene importantes implicaciones a la hora de elegir el tratamiento adecuado. Muchos de estos pacientes deberán ser sometidos a TPH con el objetivo de tratar el fallo medular, sin embargo los regímenes estándar de acondicionamiento se han asociado a un aumento de toxicidad en los SFMC como AF, DC y SSD ¹⁰⁸. Los pacientes afectados de SFMC requieren regímenes de intensidad reducida para evitar una morbilidad y mortalidad excesivas.

Por otro lado, a pesar de realizar TPH en estos pacientes, la predisposición a padecer tumores sólidos permanece, incluso en algunos casos las toxicidades de los regímenes quimioterápicos del trasplante pueden exacerbarla ¹⁰⁹. Por ello, una vez establecido el diagnóstico, los pacientes deberán seguir una monitorización exhaustiva con el objetivo de realizar una detección precoz y obtener mejores tasas de curación.

Un diagnóstico precoz de SFMC permitiría realizar una adecuada planificación familiar en aquellas familias que deseen tener más hijos. De esta forma se les ofrece la oportunidad de realizar pruebas prenatales o diagnóstico preimplantacional, consiguiendo que los futuros descendientes carezcan de la alteración genética.

Así mismo el diagnóstico de SFMC deberá descartarse en aquellos familiares que pudieran ser donantes potenciales para evitar la elección de un donante afecto. Dado que una misma mutación en un gen asociado a SFMC puede dar fenotipos ampliamente variables y síntomas de diferente gravedad, es imprescindible realizar una evaluación

médica y pruebas diagnósticas en los miembros de la familia, particularmente los hermanos del paciente. Así se podría seleccionar el donante idóneo.

Por todo lo comentado, realizar un adecuado proceso diagnóstico en los pacientes y familiares es de vital importancia.

1.4.2 El diagnóstico en los SFMC

En general, la presentación inicial de muchos de estos síndromes es a través de las malformaciones asociadas, como rasgos dismórficos, talla baja o fallo de medro. Además, hay casos en los que el fallo medular se manifiesta desde el principio, de forma que los pacientes presentan cansancio, palidez o intolerancia al ejercicio. Sin embargo, con mayor frecuencia, la primera y más significativa alteración del fracaso medular es la trombocitopenia, que se manifestará por petequias, hematomas ante mínimo traumatismo y, en los casos más graves, por sangrado clínico.

Si además dentro del estudio de estas alteraciones, se realiza un hemograma que demuestra macrocitosis de los hematíes o una elevación de la HbF por encima de los rangos adecuados a la edad, debemos sospechar un fallo medular. Por otra parte, debemos tener muy presente la historia familiar, ya que las citopenias no explicadas, los casos previos familiares de leucemia o SMD, algún otro tipo de cáncer en edades tempranas de la vida, la excesiva toxicidad a los quimioterápicos y/o la radioterapia u otras malformaciones típicas pueden orientar en gran medida el diagnóstico.

Hay que tener muy presente que cada vez es más frecuente encontrar casos asintomáticos en los familiares de primer grado, que han alcanzado la edad adulta sin haber requerido asistencia médica. En muchos casos solo una historia clínica bien dirigida es capaz de encontrar estos antecedentes.

A continuación vamos a detallar el procedimiento diagnóstico a realizar paso a paso y para ello nos basamos en tres grandes pilares: evaluación clínica, datos de laboratorio y estudios genéticos ¹¹⁰.

1.4.2.1 Evaluación clínica

1.4.2.1.1 Historia clínica

Una historia clínica exhaustiva puede revelar datos importantes que nos hagan sospechar de la existencia de un SFMC. Aunque muchos hallazgos detectados de forma aislada son inespecíficos, algunos de ellos por sí mismos pueden justificar la sospecha de un paciente con insuficiencia medular.

La historia clínica del periodo neonatal puede revelar complicaciones tales como retraso del crecimiento intrauterino o bajo peso al nacer. La talla baja es una característica común en los SFMC, aunque el crecimiento normal no lo descarta.

Como hemos ido comentando, existen SFMC con características clínicas típicas. Por ejemplo, los antecedentes de alteraciones de la piel, uñas finas y dismórficas, pelo ralo o pérdida temprana del cabello, anomalías dentales como dientes dismórficos, hipoplasia del esmalte o leucoplaquia oral (que puede confundirse fácilmente con aftas) pueden sugerir DC, aunque el fallo medular puede preceder a estos hallazgos¹¹¹. Se han descrito anomalías en los ojos y los oídos en AF y la retinopatía exudativa puede ser característica de DC⁴⁹.

Los síntomas de malabsorción como la esteatorrea o la intolerancia a los alimentos grasos pueden sugerir una disfunción pancreática exocrina, que es característica de SSD. Estos síntomas a menudo disminuyen con el tiempo, por lo que el diagnóstico subyacente de SSD se puede enmascarar fácilmente. Los síntomas gastrointestinales como diarrea, vómitos, estreñimiento, intolerancias alimentarias, falta de apetito y dolor abdominal son características que pueden estar presentes en pacientes afectados de AF o DC¹¹⁰. Las infecciones atípicas pueden ser un signo de una deficiencia inmune subyacente que puede estar asociada con DC o SSD. Los síntomas pulmonares, a menudo secundarios a enfermedad pulmonar restrictiva o fibrosis pulmonar, son una característica común de la DC. Se han descrito anomalías cardíacas en casos de AF, DC, ABD y SSD. Además, síntomas como pubertad tardía, amenorrea, menopausia prematura o infertilidad pueden ser signos de un hipogonadismo que puede aparecer en los SFMC. La TAC se encuentra en el diagnóstico diferencial del recién nacido con hemorragia y trombocitopenia sin causa aparente, como infección, medicamentos o síndrome HELLP

materno (hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y plaquetas bajas). La eritroblastopenia que se presenta en el primer año de la vida, particularmente en asociación con macrocitosis, es una presentación común de ABD.

Como parte de la evaluación de cualquier paciente con insuficiencia medular, se debe realizar el diagnóstico diferencial con otras entidades que puedan dar lugar al desarrollo de una insuficiencia medular secundaria. Por ello, es importante investigar sobre posibles procesos infecciosos, ingesta de medicamentos, enfermedades malignas, autoinmunidad, exposición a tóxicos u otras enfermedades que puedan tener origen en la médula ósea.

1.4.2.1.2 Historia familiar

Los antecedentes familiares también proporcionan información importante a la hora de realizar el diagnóstico de SFMC. Una historia que sugiera predisposición al cáncer, como aquellos que se presentan a una edad inusualmente joven, sin una etiología aparente o factores de riesgo, puede hacernos sospechar un SFMC. El espectro de cánceres familiares también puede ser informativo. Por ejemplo, se pueden observar antecedentes familiares con herencia autosómica dominante de cáncer oral, esofágico, gastrointestinal, colorrectal, LMA o linfomas asociados a ciertos subtipos de DC.

También se debe buscar cualquier historia familiar de citopenias inexplicables o aplasia medular. Hay que prestar especial atención a las manifestaciones no hematológicas de estos síndromes, ya que muchos miembros de la familia afectados pueden no manifestar ninguna alteración a nivel medular. Por ejemplo, la fibrosis pulmonar, fibrosis hepática u osteopenia son características típicas de la DC, por lo que habría que pensar en ella en estos casos. Los antecedentes familiares de pérdida fetal inexplicada o anomalías congénitas también pueden estar asociados con SFMC. En cualquier caso, se recomienda realizar las pruebas diagnósticas en todos los hermanos de pacientes afectos, así como en los progenitores.

1.4.2.1.3 Examen físico

Los hallazgos físicos asociados con SFMC generalmente no son patognomónicos de forma aislada, pero merecen consideración en el contexto del estudio de un paciente con fallo medular. En términos generales, las anomalías congénitas en asociación con

citopenias, incluso cuando son leves, justifican la sospecha de un posible SFMC. Sin embargo, los hallazgos físicos convencionales clásicamente asociados a estos síndromes pueden estar ausentes en los pacientes afectados. Por ejemplo, la tríada de leucoplaquia oral, erupción cutánea y distrofia ungueal asociada a DC puede estar ausente en los primeros años de vida e incluso en la edad adulta ¹¹². Además, también es conocido que hay pacientes afectos de AF o ABD que no presentan anomalías congénitas³. Si analizamos las características físicas por aparatos, podemos encontrar malformaciones típicas de los distintos síndromes.

En el caso de la región craneofacial, la microftalmia, el hipotelorismo, el epicanto y un amplio puente nasal pueden asociarse a fenotipo Fanconi. De la misma forma que el paladar hendido y la micrognatia están asociados con la ABD.

En cuanto al sistema esquelético, cabe destacar que las anomalías del pulgar y los defectos del radio son características frecuentes de la AF o ABD. Las anomalías del pulgar van desde deformidades graves que requieren intervención quirúrgica hasta anomalías leves sutiles como una eminencia tenar hipoplásica. Las anomalías esqueléticas pueden darse a nivel torácico como las distrofias torácicas, descritas en el SSD.

Las anomalías de la piel, como hiperpigmentación o hipopigmentación, se describen con frecuencia en pacientes con AF. Los casos de erupciones cutáneas reticulada o moteadas se asocian mayoritariamente con DC. Sin embargo, si son de tipo eccematosas, generalmente en la infancia, pueden ser características de SSD o síndrome de Wiskott-Aldrich.

En los SFMC también se han descrito anomalías cardíacas. En concreto, las alteraciones estructurales se han asociado a AF, DC y ABD, mientras que las funcionales se han asociado principalmente con SSD. La enfermedad pulmonar se asocia típicamente a pacientes con DC, incluida la fibrosis pulmonar o la enfermedad vascular pulmonar.

Las anomalías genitourinarias como el riñón pélvico, el riñón en herradura, las anomalías ureterales o uretrales son características comunes de varios de estos síndromes, así como las anomalías gonadales como el hipogonadismo, el micropene y los testículos no descendidos.

1.4.2.1.4 Datos de laboratorio

1.4.2.1.4.1 Hematología

En general, los pacientes afectados de SFMC presentan citopenias periféricas que van desde una pancitopenia grave a citopenias leves aisladas, e incluso pueden estar ausentes. En algunos casos la macrocitosis puede ser la única manifestación hematológica. Así mismo, como ya hemos comentado en apartados anteriores, los niveles elevados de HbF se asocian frecuentemente con este tipo de patologías congénitas.

Por otro lado, el estudio medular no presenta alteraciones patognomónicas en los casos de SFMC. Sin embargo, el examen de médula ósea es útil para valorar la celularidad medular y evaluar las posibles poblaciones clonales con alteraciones citogenéticas. La morfología de la médula ósea puede presentar cambios displásicos, como micromegacariocitos con un solo núcleo o doble núcleo, anomalías pseudo-Pelger o características megaloblásticas leves. La distinción entre un SFMC y el síndrome mielodisplásico puede ser difícil valorando sólo las características morfológicas o las anomalías citogenéticas. Por ello, ante la sospecha de un SFMC es recomendable realizar pruebas de laboratorio adicionales como las que se comentan a continuación.

1.4.2.1.4.2 Test de fragilidad cromosómica (TFC)

El TFC es la prueba diagnóstica básica en la AF. Se realiza en cultivos de linfocitos de sangre periférica y se basa en el análisis de lesiones cromosómicas, principalmente roturas cromosómicas y cromatídicas, inducidas por agentes que producen entrecruzamientos en el ADN, tales como DEB o MMC³⁷. Los pacientes con AF tienen un número significativamente mayor de roturas cromosómicas y formas radiales en comparación con los controles.

Esta es una prueba sensible, estandarizada y con elevada especificidad para células de pacientes afectados de AF. Los resultados se expresan en número de roturas por célula y porcentaje de células con roturas. Esta respuesta a MMC o DEB distingue la AF de la mayoría de los otros síndromes que asocian fragilidad cromosómica como la ataxia telangiectasia o el síndrome de Bloom. La excepción es el síndrome de Nijmegen, donde el aumento de roturas cromosómicas aumentada puede ser difícil de distinguir de la AF¹¹³.

Debe tenerse en cuenta, no obstante, que aproximadamente un 20 % de los pacientes con AF presenta el fenómeno de mosaicismo somático. Este proceso consiste en la expansión de células sanguíneas a partir de células que han revertido una de las mutaciones patogénicas. Estas poblaciones celulares, sin fenotipo de AF, pueden generar resultados inciertos o incluso negativos al TFC. De ahí que, ante sospechas clínicas de AF con TFC en sangre periférica dudosos o incluso negativos, es recomendable realizar el test en fibroblastos de la piel ^{114 115}, ya que no presentan reversión de las mutaciones y, por tanto, el fenómeno de mosaicismo en esta población celular es inexistente.

Las pruebas de fragilidad cromosómica deben realizarse en todos los niños y jóvenes con aplasia medular, fallos medulares congénitos y SMD. En casos de LMA y en algunos tumores en pacientes con malformaciones también debe valorarse realizar esta prueba.

1.4.2.1.4.3 Longitud de telómeros (LT)

Como se ha comentado anteriormente, la DC es causada por mutaciones en genes que afectan el mantenimiento de los telómeros. En condiciones normales, los telómeros se acortan en función de la edad, sin embargo, suelen estar más acortados de lo normal en pacientes afectos de SFMC. Por otra parte, en pacientes con DC la LT es marcadamente más corta para la edad (<1er percentil), incluso en comparación con otros pacientes afectos de insuficiencia medular ⁶³.

Actualmente es recomendable que en pacientes con fallo medular aislado u otras características de DC en ausencia de la triada clásica se realice el estudio de LT con el objetivo identificar pacientes sin el fenotipo clásico pero con la misma biología subyacente⁶². En cualquier caso, como en todos los SFMC, el estudio mutacional de DC es esencial para confirmar el diagnóstico en aquellos casos en los que el análisis de LT sea sugestivo del mismo o si la sospecha clínica es alta.

1.4.2.1.4.4 Estudios de función pancreática

Una de las características de SSD es la insuficiencia pancreática exocrina, pero no todos los pacientes manifiestan síntomas clínicos. Además, en los casos que se presentan con esteatorrea, ésta se resuelve en la mitad de los pacientes, lo que hace que la sospecha diagnóstica se retrase aún más. Las pruebas de estimulación pancreática son un procedimiento invasivo, por lo que actualmente se prefiere la determinación de los niveles

de tripsinógeno sérico e isoamilasa pancreática, ya que proporcionan información fiable sobre disfunción pancreática exocrina ¹¹⁶.

Sin embargo, se ha comentado anteriormente que la edad del paciente es importante a la hora de interpretar los resultados ya que los niveles de isoamilasa pancreática suelen ser bajos antes de los 3 años, incluso en controles sanos, por lo que esta prueba es mejor utilizarla en pacientes de mayor edad. Por otro lado, los niveles de tripsinógeno a menudo aumentan al rango normal más allá de los 3 años, incluso en pacientes con SSD, por lo que esta prueba es más sensible en pacientes más jóvenes ¹¹⁷.

1.4.2.1.4.5 ADA eritrocitario

Los niveles de ADAe están elevados en aproximadamente el 80% de los pacientes afectados por ABD. Se desconoce el motivo de este hallazgo, pero aun así ha demostrado ser un marcador de diagnóstico útil. La elevación de ADAe característica de ABD, fue descrita por primera vez en 1983 por Glader y colaboradores¹¹⁸. Esta determinación tiene una sensibilidad del 84% y especificidad del 95% para el diagnóstico de ABD en comparación con otros SFMC. Por tanto, un nivel elevado de ADAe apoya la sospecha de ABD. Sin embargo, hasta un 16% de los pacientes afectados de ABD, tienen niveles normales de ADAe, por lo que una determinación dentro de la normalidad no excluye el diagnóstico⁸⁶.

1.4.2.1.5 Estudios moleculares

Como se ha comentado a lo largo de todo este texto, los SFMC son un grupo heterogéneo de enfermedades con fenotipos clínicos, edades de presentación y patrones de herencia muy variables. Los pacientes pueden presentarse sin alteraciones sindrómicas o incluso sin signos de fallo medular, por lo que todo este procedimiento supone un gran desafío. En muchos casos, a pesar de haber realizado una adecuada orientación clínica basada en la historia del paciente y la exploración, y habiendo realizado las pruebas de laboratorio oportunas, es posible que no alcancemos el diagnóstico definitivo.

Los SFMC, al igual que la mayoría de las enfermedades monogénicas, están causados por mutaciones en las regiones codificantes e intrónicas adyacentes de genes que codifican una proteína, alterando su función y provocando el fenotipo patológico. Localizando dichas mutaciones en los genes asociados a la enfermedad alcanzaremos el

diagnóstico molecular definitivo. Por ello, las pruebas genéticas son una herramienta indispensable en la evaluación diagnóstica de los SFMC, especialmente en el contexto de presentaciones atípicas o en pacientes adultos.

En este contexto, a lo largo de los años se han desarrollado diferentes técnicas de diagnóstico genético que han ido evolucionando hasta llegar a las plataformas de secuenciación masiva que, son una realidad actualmente y parte del objetivo de esta tesis.

1.5 Introducción al diagnóstico genético: de Sanger a NGS

Podría decirse que la evolución en las técnicas de diagnóstico genético se inicia con la descripción en 1977 por Fred Sanger y colaboradores, de un nuevo método de secuenciación transformando la biología de nuestros días. Este método se denominó “secuenciación Sanger” y se basa en la incorporación de didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) como terminadores de la cadena de ADN^{119 120}. Para llevar a cabo este proceso, se requiere ADN de cadena sencilla, un cebador de ADN, ADN polimerasa y ddNTPs con nucleótidos marcados con fluorescencia. Estos ddNTPs terminan la elongación de la cadena al carecer del grupo 3'-OH produciendo varios fragmentos de ADN de longitud variable¹²¹. La ventaja principal de esta técnica es que tiene tasas extremadamente bajas de falsos positivos y negativos, con un alto grado de especificidad^{122 123}. Sin embargo, este procedimiento, ampliamente aceptado tanto por clínicos como por investigadores en genética, conlleva una serie de limitaciones en relación coste-eficiencia cuando se aplica a enfermedades genéticamente heterogéneas donde no existe un único gen responsable sino un grupo de genes potencialmente candidatos¹²⁴. De esta forma, hasta hace poco, la estrategia diagnóstica de este tipo de enfermedades consistía en realizar la secuenciación Sanger del gen más frecuentemente mutado. En caso de detectarse la mutación, podía confirmarse el diagnóstico molecular, de lo contrario era necesario ir secuenciando uno a uno todos aquellos genes que le siguen en frecuencia, pudiéndose llegar o no al diagnóstico final.

A pesar de que la secuenciación Sanger sigue siendo una técnica ampliamente utilizada en diagnóstico e investigación, posee una serie de limitaciones, principalmente económicas y de velocidad, ya que el proceso de secuenciación puede llegar a ser extremadamente costoso y lento. Esta es la razón por la que en los últimos años se ha fomentado la investigación en nuevas técnicas moleculares, surgiendo de esta forma un conjunto de tecnologías de alto rendimiento denominadas de nueva generación o secuenciación masiva.

Este tipo de técnicas son capaces de determinar la secuencia de fragmentos de ADN de una manera más rápida y económica que la secuenciación tradicional¹²⁵ ya que consiguen secuenciar en paralelo millones de fragmentos de ADN en múltiples individuos, lo que redundará en un abaratamiento de costes y tiempo¹²⁶. Un ejemplo muy

ilustrativo mediante el que se puede comparar ambas técnicas es el coste de secuenciar un genoma humano. Así, mientras que mediante la secuenciación Sanger este proceso podría tener un coste aproximado de 10 millones de dólares por genoma, las técnicas de NGS permiten obtener la misma secuencia por un precio de 1000 dólares y en unos pocos días. Estas características hacen que durante los últimos años las técnicas NGS se estén implantando como método estándar tanto en el ámbito clínico como investigacional.

A finales de la pasada década comenzaron a desarrollarse las diferentes plataformas NGS que conocemos como de segunda generación. La primera plataforma de secuenciación masiva que se comercializó fue el 454 Genome Sequencer de Life Science. Esta plataforma se basaba en la técnica de pirosecuenciación¹²⁷, y conseguía inicialmente lecturas simples, de 100-150 pares de bases (pb), hasta completar 200 Mb de secuencia. Tras sucesivas evoluciones, esta plataforma consiguió alcanzar longitudes de lectura de aproximadamente 700 pb y un volumen total de secuencia de 14 Gb. No obstante, aunque en sus inicios la plataforma 454 constituía una alternativa rápida y eficiente, esta herramienta dejó de comercializarse en 2013 por su incapacidad de competir con las nuevas plataformas iban desarrollándose.

Al poco tiempo de la aparición de la plataforma 454, surgieron otras dos caracterizadas por la identificación de las bases por fluorescencia y por la generación de un número muy superior de lecturas, más cortas pero más precisas. Por un lado, Applied Biosystems desarrolló en 2006 el sistema SOLiD (Sequencing by Oligo Ligation Detection) basado en la tecnología de secuenciación por ligación de nucleótidos marcados¹²⁸. Por otro lado, la compañía Illumina desarrolló de forma paralela distintos modelos de secuenciadores tras adquirir el primer Genome Analyzer comercializado por Solexa en 2006. Todos los secuenciadores de Illumina (HiSeq, MiSeq, NextSeq, etc.) utilizan la tecnología de secuenciación por síntesis¹²⁹. En la actualidad, los secuenciadores de Illumina pueden conseguir lecturas de 2 x 300 pb hasta 15 Gb y 25 millones de lecturas (modelo MiSeq) o bien lecturas de 2 x 150 pb hasta 1800 Gb y 6.000 millones de lecturas (modelo HiSeqX).

En 2010, Ion Torrent comercializó su sistema PGM (Personal Genome Machine), que incorporaba la tecnología de semiconductores y no dependía del uso de fluorescencia, sino de los cambios en pH que se producen cuando se libera un protón al incorporarse a

una molécula de ADN. El sistema PGM es capaz de generar lecturas largas desde 400 pb hasta 2 Gb. La evolución de la tecnología de semiconductores ha desembocado en los secuenciadores Ion Proton, que son capaces de generar lecturas de 200 pb hasta 10 Gb y 80 ML.

Más recientemente, se ha desarrollado la denominada secuenciación de tercera generación. Las principales diferencias de las plataformas de tercera generación con las de segunda generación radican en la no necesidad de realizar una PCR antes de la secuenciación, reduciendo el tiempo de análisis y los errores derivados de ésta, y en que la detección de nucleótidos se realiza en tiempo real. La plataforma PacBio se basa en fluorescencia para identificar los nucleótidos mediante un procedimiento de secuenciación de una única molécula en tiempo real. Los secuenciadores PacBio RS operan acortando mucho los tiempos y consiguiendo una longitud media de secuencia de 4.200 a 8.500 pb, llegando hasta los 30.000 pb.

Por otra parte, la secuenciación Nanopore utiliza un bioporo macroscópico de muy pequeño diámetro similar a un canal iónico de una membrana plasmática, por el que transitan las moléculas de ADN o proteínas, produciendo una interrupción del voltaje a través del canal¹³⁰ y cuyo registro permite identificar la secuencia de nucleótidos. Oxford Nanopore Technologies ha comercializado una serie de secuenciadores que utilizan esta tecnología (MinIon PromethIon y GridIon).

Entre los últimos sistemas de secuenciación de tercera generación que se encuentran en fase de desarrollo y comercialización se encuentran el sistema Stratos, apoyado por Roche, y que utiliza la tecnología de secuenciación por expansión basado en nanoporos, o el sistema de transferencia energética de resonancia de la fluorescencia (FRET), que se basa en microscopía electrónica y que es la apuesta más firme de Thermo Fisher Scientific en las tecnologías de secuenciación de tercera generación. Las características de las principales plataformas se resumen en la tabla 1.13.

GENERACIÓN	PLATAFORMA	TECNOLOGÍA	TAMAÑO LECTURA (pb)	GB TOTALES	COMPAÑÍA
PRIMERA	Sanger	Longitud didesoxinucleótidos	~ 1000	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, US
	Roche 454	Pirosecuenciación	~ 700	14	Hoffmann-La Roche-Ltd, Basilea, Suiza
SEGUNDA	SOLiD	Ligación y codificación por dos bases	2x75	320	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, US
	Illumina/Solexa	Secuenciación por síntesis	2x150	1800	Illumina Inc., San Diego, Ca, USA
	PGM/Ion Proton	Tecnología de semiconductores	2000	5	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, US
	Helicos	Secuenciación individual con moléculas fluorescentes	70	20	Helicos Biosciences, Cambridge, Ma, USA
	PacBio	Secuenciación de una única molécula en tiempo real	30000	1 (por celda o canal)	Pacific Biosciences Menlo Park, Ca, USA
TERCERA	Nanopore	Bioporos	200000	12000	Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido
	FRET	Transferencia energética de resonancia de la fluorescencia	-	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, US
	Stratos	Secuenciación por expansión	-	-	Hoffmann-La Roche-Ltd, Basilea, Suiza

Tabla 1.13: Características de las principales plataformas de secuenciación masiva.

1.5.1 Aplicaciones de las técnicas NGS.

El uso de las técnicas de NGS en los últimos años ha permitido un desarrollo muy importante del diagnóstico genético de laboratorio, así como del conocimiento generado por la investigación sobre las bases genéticas de muchas enfermedades.

Hay tres procesos generales que se han desarrollado en NGS: secuenciación del genoma completo (WGS, del inglés “*Whole genome sequencing*”), secuenciación completa del exoma (WES, del inglés “*Whole exome sequencing*”) y secuenciación de genes específicos (TGS, del inglés “*Targeted gene sequencing*”).

1.5.1.1 Secuenciación del genoma completo (WGS)

La tecnología WGS es capaz de secuenciar todo el genoma en una sola ejecución, incluyendo regiones codificantes y no codificantes, por lo que el abanico de aplicaciones que ofrece este tipo de aproximación es inmenso. Su principal ventaja es la posibilidad de tener disponible la totalidad de la información genómica. Sin embargo, este hecho genera una gran cantidad de datos que requieren personal cualificado capaz de realizar un amplio filtrado de la información para poder proporcionar datos significativos.

Por tanto, debido al alto coste que aún hoy presenta la WGS y a la complejidad de manejar tal cantidad de datos, esta aproximación no suele ser la primera opción para la búsqueda de variantes genéticas asociadas a una determinada enfermedad. En su lugar, se tiende a utilizar métodos alternativos referidos a una fracción más concreta del genoma humano como puede ser WES o paneles de un número determinado de genes de interés.

1.5.1.2 Secuenciación del exoma completo (WES)

En el caso del WES, al presentar un alto impacto en el diagnóstico molecular de distintas entidades clínicas, a día de hoy suele ser la técnica de elección en el campo de la investigación clínica para la búsqueda de nuevos genes implicados en la enfermedad a estudio¹³¹. Dado que el conjunto de regiones exómicas constituye entre el 1-2% de todo el genoma, WES permite interrogar todos los genes del genoma con una reducción notable de los costes frente a la WGS. Sin embargo, aunque varios autores han puesto de manifiesto que la mayoría de variaciones funcionales están en regiones codificantes del genoma^{132 133}, se estima que un gran porcentaje de los casos que quedan por resolver tras

ser sometidos a WES pueden ser portadores de mutaciones en zonas no codificantes (intrones, regiones reguladoras, etc.)^{134 135}. En este sentido, la WGS sería la única aproximación que permitiría el diagnóstico molecular de los casos no resueltos por otras estrategias. De hecho, dada la sorprendente rapidez con la que están evolucionando estas tecnologías, es posible pensar que una vez que el coste de la WGS llegue a valores más asumibles por los centros de investigación y/o de diagnóstico, esta secuenciación podría desbancar a la WES al ser capaz de conseguir valores de calidad superiores o similares con una mayor homogeneidad en el número de lecturas a lo largo de toda la secuencia genómica¹³⁶, mostrando una mayor capacidad para la detección de variación del número de copias (del inglés, *copy number variants*, CNVs) y otras variantes estructurales¹³⁷.

1.5.1.3 Secuenciación de paneles de genes (TGS)

El diseño de paneles de NGS establece la captura de exones y regiones intrónicas flanqueantes de un número de genes determinado. Esta aproximación es la opción más usada para el diagnóstico de enfermedades de base genética, ya que su tamaño relativamente pequeño permite disminuir el coste por muestra secuenciada, acelera el proceso diagnóstico, facilita el posterior análisis bioinformático y almacenaje de los datos y reduce notablemente las implicaciones éticas al disminuir notablemente el número de hallazgos inesperados. En patologías como los SFMC, la tasa diagnóstica se sitúa en torno al 50%, y es preciso mencionar que en la mayoría de los casos se trata de pacientes analizados previamente por otras técnicas con las que no se obtuvo un diagnóstico genético^{106 138}. Lo interesante de esta estrategia es que puede servir como primer filtro para seleccionar aquellas familias susceptibles de tener una causa genética que implique a una región o mecanismo molecular no asociado previamente a la enfermedad.

1.5.2 Aplicación de las técnicas NGS en el diagnóstico de SFMC

Como ya se había indicado previamente, la aparición de las técnicas NGS han cambiado por completo el proceso diagnóstico de los SFMC, puesto que esta tecnología permite la evaluación de cientos o incluso miles de genes en paralelo de forma asequible. Estas nuevas aproximaciones de diagnóstico molecular, que ya demostraron su utilidad en otras patologías, se han aplicado también en el estudio de los SFMC a lo largo de los últimos años.

Sin embargo, no hay que olvidar que en el campo de los SFMC la secuenciación Sanger aún tiene cabida en el proceso diagnóstico. Por ejemplo, para detectar mutaciones en un solo gen es una estrategia razonable cuando un fenotipo clínico claro sugiere un diagnóstico concreto. Es el caso de pacientes con sospecha de SSD, en los que secuenciar mediante Sanger el gen *SBDS* puede ser una aproximación rentable. Además, cuando una mutación o mutaciones han sido identificadas previamente en un individuo afecto, esta herramienta de diagnóstico molecular también puede ser útil para testar la mutación previamente identificada en miembros de la familia.

En cualquier caso, la mayoría de los casos los SFMC presentan amplia variabilidad genética. Es por ello que en estos casos la secuenciación de un elevado número de genes puede ser quizás la aproximación más acertada. En concreto, las estrategias TGS ofrecen una opción de alto rendimiento en el estudio de este tipo de pacientes como han demostrado diferentes grupos internacionales.

Las primeras aproximaciones en este campo fueron descritas por Zhang y colaboradores a principios de 2015 ¹³⁹. Este grupo incluyó en el estudio un total de 71 pacientes, tanto adultos como pediátricos, diagnosticados clínicamente de SFMC/SMD clasificable en los que no se había alcanzado el diagnóstico molecular previamente. Diseñaron un panel que incluía un total de 85 genes relacionados con SFMC y SMD. Los datos de cobertura media fueron de 549x, estando el 97.8% de las bases por encima de 50x. En este trabajo, detectaron mutaciones asociadas a la enfermedad en 8 de los 71 pacientes estudiados (11%), siendo los genes responsables *GATA2* (en 5 pacientes), *RUNX1*, *DKC1* y *LIG4*.

Posteriormente, el trabajo realizado por Ghemlas y colaboradores ¹³⁸ arroja resultados muy prometedores con esta aproximación. Diseñaron un panel que incluía un total de 72 genes relacionados con el desarrollo de SFMC y estudian a 158 pacientes afectados. Los datos de cobertura media estaban en 680x, con un 91.2% de las bases por encima de 100x. En este caso, los pacientes fueron divididos en dos grupos: aquéllos que presentaban SFMC con características típicas de algún síndrome específico (AF, ABD, DC, SSD, NCG, TAR), a los que definieron como SFMC clasificable; y aquéllos que no presentaban ninguna característica típica, denominados SFMC inclasificable. La tasa diagnóstica global fue de un 38% (61/158), aunque los resultados varían al valorarlos por grupos. En el grupo de fallo medular definido o clasificado, obtuvieron diagnóstico molecular en 59% (44/75). Sin embargo, no se obtuvo el mismo rendimiento en el grupo de fallo medular indefinido o no clasificado, en el que la tasa de diagnóstico se situaba en el 18% (17/83). Además, en este trabajo analizan la tasa de rediagnósticos que fue del 9%, lo que supone un gran impacto ya que implica cambios en el manejo clínico de estos pacientes. Finalmente, dentro del grupo de SFMC definido analizaron las tasas diagnósticas en función de la patología, así el síndrome con mayor tasa de detección molecular mediante esta aproximación fue AF con un ratio diagnóstico del 75%, seguida de ABD (70%), NCG (40%), DC (40%) y SSD (20%).

En 2016, el grupo de Keel ¹⁴⁰ realiza una aproximación diferente en la que analizan 205 pacientes afectados de aplasia medular adquirida (AMA) y SMD mediante un panel NGS con genes asociados a SFMC. Observan que un 5% de los pacientes diagnosticados de AM adquirida y un 13.6% de los diagnosticados de SMD presentan mutaciones patogénicas en genes asociados a SFMC.

Finalmente, en 2017 Muramatsu y colaboradores ¹⁴¹ diseñaron un estudio en el que analizan 121 pacientes con sospecha de SFMC mediante un panel en el que incluyeron un total de 184 genes. Alcanzan una tasa diagnóstica del 44%, sin diferenciar en este caso entre SFMC definidos o indefinidos. Lo que sí analizaron fue el rendimiento diagnóstico en función de la patología. Según sus datos, el síndrome con una mayor tasa de diagnóstico molecular mediante esta aproximación es AF con un 68% y SSD con el 67%. A ellos les siguen en frecuencia ABD (46%), DC (38%), trombocitopenia familiar (33%), NCG (29%) y otros fallos medulares (30%).

En general, todos los grupos concluyen que la secuenciación dirigida mediante paneles NGS es una aproximación rápida, precisa y rentable para el diagnóstico molecular en pacientes con SFMC. Incluso alguno de ellos llega a proponer esta aproximación como la prueba diagnóstica molecular de primera línea a realizar cuando hay múltiples genes candidatos a desarrollar la patología que presenta el paciente, lo que podría aplicarse a la mayoría de los pacientes con SFMC.

Por otra parte, no solo los paneles dirigidos han demostrado su utilidad en el diagnóstico de SFMC. La secuenciación del exoma también ofrece grandes ventajas, principalmente en la evaluación de pacientes en los que no se han identificado mutaciones en genes asociados a SFMC conocidos. Ampliar esta cobertura puede ser útil, especialmente cuando los paneles de genes dirigidos no han identificado la mutación causal. Además, el descubrimiento de nuevos genes a través de WES ha ampliado el conocimiento de las bases moleculares de los SFMC, aunque no hay que olvidar que esta aproximación complica extremadamente el análisis de los resultados.

No obstante, también ha habido grupos que han demostrado la utilidad de WES en el ámbito de los SFMC. En concreto, el trabajo de Muramatsu¹⁴¹ comentado anteriormente, realiza un segundo análisis en el que incluyen 250 pacientes a los que estudian mediante WES. En este grupo de pacientes la tasa diagnóstica fue del 27%, inferior a la que obtuvieron mediante secuenciación dirigida. Sin embargo, un trabajo más reciente de Soulier y colaboradores, aporta resultados prometedores en este ámbito. Estudian un total de 179 muestras de pacientes con sospecha de SFMC sin fenotipo clínico definido mediante WES, alcanzando una rentabilidad diagnóstica del 48%¹⁰⁷.

Por tanto, parece que a pesar de las limitaciones que puede tener la secuenciación del exoma en cuanto a análisis de resultados, esta herramienta también ha demostrado su utilidad en el campo de los SFMC. En la tabla 1.14 se detallan el uso y las limitaciones de las principales estrategias NGS.

MÉTODO	USO	LIMITACIONES
Single gene analysis (secuenciación Sanger)	<p>Considerar cuando la sospecha clínica de un gen específico es alta</p> <p>Ejemplo: secuenciar <i>SBDS</i> ante sospecha de SSD</p>	<p>A veces se limita a una mutación específica o una región dentro de un solo gen</p> <p>La secuenciación de Sanger puede pasar por alto CNVs</p> <p>Es costosa y consume mucho tiempo</p>
Secuenciación dirigida (panel de genes)	<p>Herramienta útil para la evaluación inicial de un elevado número de genes</p> <p>Puede optimizar la cobertura de genes y regiones de interés</p>	<p>Amplia variabilidad entre paneles con respecto a qué genes se incluyen</p> <p>Algunos paneles genéticos no están diseñados para detectar CNVs</p> <p>La cobertura de ciertos genes y regiones codificantes puede ser pobre</p>
Secuenciación del exoma (WES)	<p>Útil para el descubrimiento de genes, particularmente si no se hallan mutaciones en genes conocidos</p> <p>A menudo se realiza si el análisis de panel de genes es negativo, pero existe una sospecha elevada de SFMC.</p>	<p>Cobertura variable, por lo que pueden no detectarse mutaciones en genes conocidos si la cobertura es pobre</p> <p>Puede no detectar mutaciones patogénicas en regiones reguladoras no codificantes, como promotores y potenciadores</p>
Secuenciación del genoma (WGS)	<p>Puede considerarse si la secuenciación del exoma es negativa o si hay sospecha de que una mutación puede estar en una región no codificante. Normalmente se realiza dentro de proyectos de investigación.</p>	<p>El análisis es extremadamente complejo</p>

Tabla 1.14: Usos y limitaciones de las principales estrategias NGS.

1.5.3 Principales limitaciones de las técnicas NGS

Las enfermedades genéticas heterogéneas han puesto sobre la mesa la dificultad tecnológica de estudiar de forma eficiente todos los genes implicados en una patología y, como se ha comentado, las técnicas NGS parecen solventar ese problema¹²⁴. Así mismo, en el ámbito de los SFMC también han demostrado su elevada capacidad diagnóstica. Sin embargo, estas técnicas también tienen sus limitaciones.

En concreto, los paneles de genes son una opción muy rentable para el diagnóstico de los SFMC, ya que su tamaño relativamente pequeño permite disminuir el coste por muestra secuenciada y acelera el proceso diagnóstico, facilitando el posterior análisis y almacenaje de los datos. Sin embargo, una de las limitaciones inherentes a la secuenciación dirigida es que el número de genes está definido previamente. Esto supone una limitación importante, ya que obliga a realizar actualizaciones periódicas de los genes incluidos en el diseño para asegurar que todos los descritos hasta el momento están siendo estudiados. Además, este hecho lleva implícito que no existe posibilidad de descubrir nuevos genes, ventaja que sí ofrece WES.

Por otra parte, hay una serie de limitaciones que son comunes a las diferentes herramientas NGS como son la necesidad de validación de los hallazgos, el análisis de la patogenicidad de las variantes o el manejo de la información que se genera.

En primer lugar, según las recomendaciones de las guías europeas para el diagnóstico mediante NGS, hasta la fecha se requiere la validación mediante Sanger de los hallazgos encontrados¹⁴². Este punto genera cierta controversia ya que, además de suponer un aumento del coste del procedimiento, ha llegado a plantear dudas sobre su utilidad. El grupo de Beck y colaboradores se plantea esta cuestión y secuencian mediante Sanger un total de 5800 variantes detectadas mediante WES¹⁴³. De todas estas variantes tan solo 19 no fueron validadas en un primer análisis. Tras rediseñar los *primers*, se secuenciaron de nuevo, confirmándose 17 de las 19 no validadas inicialmente. Finalmente, tan solo detectaron dos variantes que no fueron confirmadas, lo que atribuyen a unos datos de calidad muy bajos en la secuenciación WES. Dados estos resultados, concluyen que la validación mediante Sanger parece tener una utilidad limitada que además implica cierto porcentaje de falsos negativos.

En segundo lugar, quizás la mayor limitación que presentan las técnicas NGS es la generación masiva de datos y el análisis de los mismos. La correcta identificación y caracterización del conjunto de variantes presentes en una muestra es uno de los procesos clave y más sensible para la correcta aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico genético, no sólo debido a la enorme cantidad de datos que han de manipularse al mismo tiempo sino también por la gran complejidad biológica que plantea

144.

Los diversos criterios que se han utilizado para considerar una variante como patogénica incluyen la ausencia de la variante en una amplia cohorte de individuos de la misma raza, la afectación de un residuo aminoácido altamente conservado en la evolución, y la afectación funcional de la proteína, evaluada mediante programas bioinformáticos (modelos *in-silico*) o bien por modelos animales. Sin embargo, todos estos criterios deben ser interpretados con precaución. Por ejemplo, es el caso de los programas diseñados para predecir si las variantes pueden ser perjudiciales en función de la conservación evolutiva o los efectos estructurales previstos, que pueden resultar muy útiles pero a su vez arrojan información confusa. Además, todos estos criterios dependen de datos que pueden evolucionar con el tiempo y sufrir modificaciones.

Sin embargo, hay ciertas situaciones que proporcionan evidencias sólidas de que la variante puede ser patogénica. Por ejemplo, la demostración de que la variante coincide con el fenotipo del paciente y además se detecta en múltiples familias no relacionadas con las mismas características, proporciona evidencia elevada de patogenicidad. Otro ejemplo puede ser la presencia de la variante en múltiples individuos afectados, junto con ausencia de la misma en bases de datos genéticas de poblaciones sanas. Uno de los criterios que más pesa en determinar la patogenicidad de una variante es la cosegregación familiar de la mutación, considerándose una de las pruebas más esclarecedoras para clasificar una variante como mutación causal o todo lo contrario¹⁴⁵. Sin embargo, no todas las situaciones proporcionan suficiente evidencia, los casos en los que se detectan variantes con penetrancia incompleta o en pacientes en los que las características clínicas típicas aparecen de forma tardía, pueden dar lugar a interpretaciones engañosas. Además, podemos encontrarnos con la identificación de variantes no claramente patogénicas, las llamadas variantes de significado incierto (VOUS, del inglés “*variant of unknown significance*”), que suponen uno de los problemas fundamentales inherentes a la NGS.

Todo ello hace que sea imprescindible evaluar con precaución los hallazgos detectados para discernir si constituyen variantes de la normalidad o si por el contrario pueden ser alteraciones causales de la enfermedad a estudio.

Por tanto, dado que no es fácil determinar con claridad lo que es patogénico y lo que no, una comprensión de la función del gen de interés puede guiar la interpretación de una variante. Por ejemplo, las variantes que afectan los residuos de aminoácidos o los dominios que son críticos para la función de las proteínas pueden ser las más perjudiciales, aunque no siempre es así. Por ello, la integración de las pruebas genéticas con pruebas funcionales y una evaluación clínica adecuada, puede ayudarnos a orientar la patogenicidad de los hallazgos. Para los genes de función conocida, las pruebas funcionales pueden ser útiles, aunque generalmente solo están disponibles en laboratorios de investigación. Sin embargo, pruebas como el test de fragilidad cromosómica o el estudio de la longitud telomérica son pruebas funcionales que pueden ser útiles para valorar el efecto funcional de variantes inciertas y no son exclusivas de laboratorios de investigación. Por ejemplo, una variante en un gen asociado a AF que confiere un aumento de roturas cromosómicas con MMC o DEB, ofrece evidencia de patogenicidad.

En tercer lugar, es importante señalar que esta potente tecnología plantea problemas del manejo de la información obtenida. Al estudiar una gran cantidad de genes a la vez o en el caso de la secuenciación completa del genoma, vemos que cada individuo nos ofrece un mayor y mejor conocimiento de genes deletéreos y su implicación o no en futuras enfermedades, potenciando de esta forma la medicina predictiva, preventiva y personalizada. Pero, por otro lado, aporta una ingente información sobre predisposición a ciertas enfermedades que debe ser adecuadamente tratada y gestionada. De esta forma, podemos encontrar un gran número de resultados inesperados o no solicitados por el paciente, por lo que es necesario definir los aspectos bioéticos en relación al derecho a conocer nueva información sobre genes que a priori no eran objeto de estudio. Por ejemplo, es el caso de genes como *BRCA1*, en el que ciertas mutaciones homocigotas implican el desarrollo de AF pero que a su vez puede presentar variantes heterocigotas que pueden predisponer a cáncer de mama²⁷. Estos hallazgos pueden suponer un nuevo enfoque diagnóstico de la enfermedad, por lo que es indispensable el abordaje multidisciplinario para el manejo de este tipo de información. Además, estos resultados podrían ser trascendentales en el ámbito familiar, precisando el asesoramiento de

familiares afectos o portadores, estableciendo medidas de prevención, asesoramiento reproductivo y recomendaciones a nivel de diagnóstico prenatal y preimplantacional.

A pesar de las limitaciones que ofrecen estas técnicas, la tendencia actual es que este grupo de tecnologías consigan implantarse de forma rutinaria para el diagnóstico de enfermedades genéticamente heterogéneas. Sin embargo, para alcanzar este objetivo es imprescindible implementar guías consensuadas para el manejo de la enorme cantidad de datos generada, la interpretación biológica y clínica de estos datos y la información al paciente y su familia. Para todo ello, se hace imprescindible contar con profesionales con experiencia en el análisis e interpretación de las variantes. Igualmente, son indispensables nuevos desarrollos y actualizaciones de bioinformática, estudios de segregación familiar, demostración de ausencia de la variante en la población normal y estudios funcionales que permitan determinar el significado biológico y la patogenicidad de las variantes identificadas, así como su integración en bases de datos que permitan la correlación genotipo-fenotipo.

2. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

2.1 Hipótesis

La caracterización de las bases genéticas responsables de la enfermedad en pacientes con SFMC es imprescindible para establecer el diagnóstico correcto, definir el pronóstico de la enfermedad y realizar el tratamiento más adecuado. Este tipo de diagnóstico genético es muy dificultoso, suponiendo además un elevado esfuerzo y coste debido a la enorme heterogeneidad genética, la abundancia de mutaciones privadas y solapamiento fenotípico entre los diferentes síndromes. El desarrollo de herramientas diagnósticas específicas, rápidas y rentables implicaría un avance importantísimo en el campo de los SFMC.

2.2 Justificación

Los SFMC se caracterizan por la presencia de fallo medular, anomalías físicas, amplia variabilidad genética y predisposición a cáncer. El diagnóstico clínico en los SFMC es extremadamente complejo ya que existe un abanico muy amplio de síndromes asociados al desarrollo de fallo medular y, al mismo tiempo, presentan un gran solapamiento fenotípico.

Por otra parte, los SFMC son patologías con base molecular, por tanto, la detección de la alteración va a permitir establecer el diagnóstico definitivo. De esta forma es posible definir el pronóstico de la enfermedad, establecer las medidas terapéuticas adecuadas y ofrecer consejo genético a paciente y familiares. Sin embargo, hasta la fecha se han descrito más de 100 genes implicados en estas patologías, lo que complica aún más el proceso diagnóstico.

Hasta hace poco, en la práctica clínica el diagnóstico molecular se limitaba al estudio de los genes frecuentemente mutados mediante técnicas de secuenciación convencionales. Sin embargo, el gran número de genes descritos hace difícil alcanzar el diagnóstico molecular mediante esta aproximación ya que la estrategia de estudio gen a gen consume mucho tiempo, es laboriosa y costosa e impide detectar con rapidez la mutación causante de la enfermedad.

La secuenciación masiva permite la obtención de miles de fragmentos de ADN en un único proceso ya que utiliza una combinación de nuevas estrategias en la preparación

de muestras y nuevos métodos de secuenciación, siendo posible un análisis genético de todos los genes de interés en pocas semanas. De esta forma se disminuye el tiempo de estudio, mejorando la efectividad y eficiencia en el diagnóstico.

Estos avances tienen grandes implicaciones en la práctica clínica ya que se necesita integrar estos hallazgos genéticos en el manejo clínico de los pacientes como herramienta diagnóstica y, en el futuro, establecer el pronóstico y posibles tratamientos personalizados. Sin embargo, es indispensable que la tecnología de secuenciación masiva sea validada previamente a su aplicación en el diagnóstico de los SFMC.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos

- Analizar el rendimiento del panel de secuenciación masiva diseñado para pacientes con sospecha de fallo medular congénito.
- Analizar la capacidad diagnóstica del panel de secuenciación masiva en todos los pacientes con sospecha de fallo medular congénito incluidos en el estudio.
- Analizar si la capacidad diagnóstica del panel NGS difiere entre los distintos grupos clínicos de este estudio.
- Desarrollar una estrategia de estudio que incluya técnicas de secuenciación masiva para el diagnóstico molecular de los SFMC.

4. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Pacientes

Entre julio de 2015 y julio de 2017 se remitieron un total de 130 muestras de pacientes con sospecha de SFMC desde 30 centros españoles para el estudio. Todos los pacientes estudiados leyeron y firmaron el consentimiento informado (anexos I y II) que permite el estudio y el almacenaje de su muestra de ADN, así como el registro de sus datos clínicos.

Todos los pacientes fueron remitidos por sospecha de fallo medular congénito, según el criterio del especialista de referencia. Esta sospecha se basó en la presencia de citopenia/s de origen central; presencia de anomalías físicas (crecimiento, esquelético, neurológico, genitourinario, cardíaco, pulmón, hígado, piel, uñas o cabello); antecedentes familiares sugestivos (familiares consanguíneos o antecedentes en la familia de trastornos hematológicos) y/o inicio de los síntomas en edad joven.

Cuando el especialista tenía la sospecha de un nuevo caso de SFMC, contactaba con nuestro grupo para posteriormente remitir el consentimiento informado y un registro de datos clínicos básicos (anexo III) junto con una muestra de 5 ml en EDTA de sangre periférica. Al llegar al laboratorio, se realizaba la extracción del ADN necesario para realizar la secuenciación. Posteriormente los datos fueron analizados por el equipo bioinformático para proceder al filtrado de variantes. Este flujo de pacientes se detalla en la figura 4.1.

Según los datos clínicos aportados, los pacientes remitidos se dividieron en dos grupos en función del motivo de derivación. En el primer grupo se incluyeron a los pacientes remitidos con las siguientes sospechas clínicas: anemia de Fanconi, eritroblastopenia congénita, Disqueratosis congénita, síndrome de Shwachman-Diamond, trombopenia amegacariocítica congénita, mielodisplasia hereditaria, anemia diseritropoyética congénita, neutropenia congénita grave y trombopenia. A este grupo se le denominó “fallo medular definido” (FMD). El segundo grupo denominado como “fallo medular indefinido” (FMI) se compuso de aquellos pacientes que no presentaban ninguna característica específica de los grupos anteriormente mencionados.

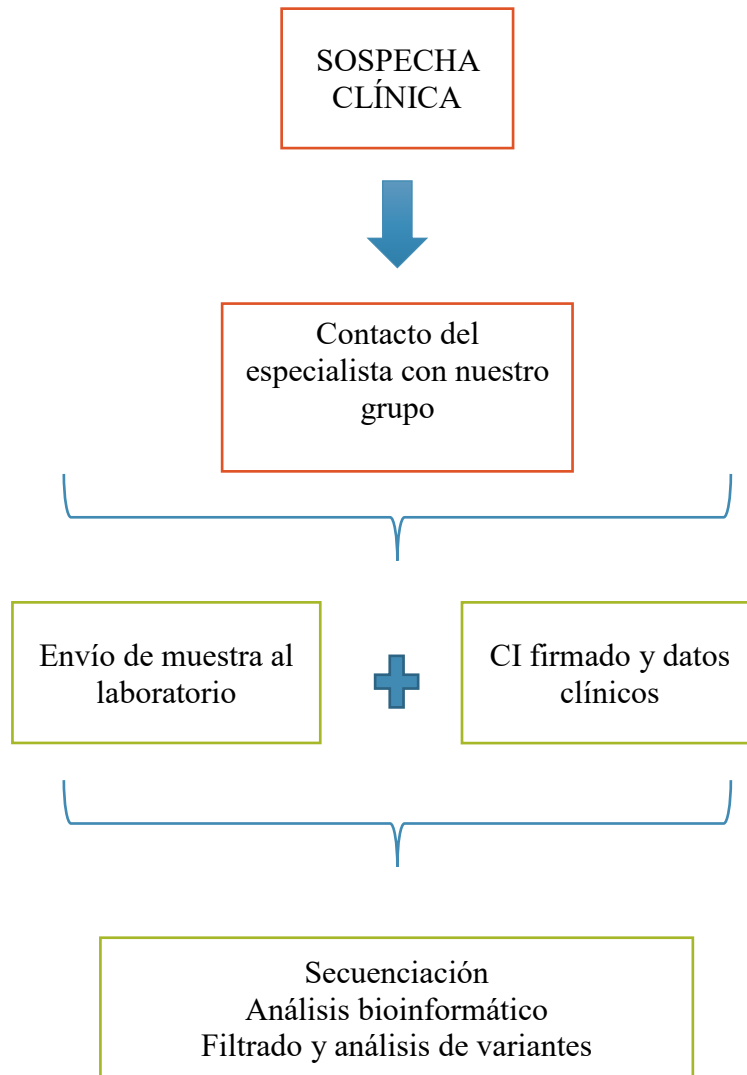


Figura 4.1: Circuito para la inclusión de muestras en el panel de secuenciación masiva.

4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1 Registro de datos clínicos

El registro de datos clínicos se realizó en base a los datos aportados por el especialista responsable del paciente. Se solicitó el envío de un cuestionario en el que se recogieron datos demográficos, antecedentes familiares y personales, enfermedades asociadas y estudios complementarios. El cuestionario de recogida de datos se detalla en el anexo III.

4.2.2 Selección de genes candidatos

Para la selección de los genes a incluir, se consultaron las bases de datos disponibles.

- ❖ On Mendelian Inheritance in Man (OMIM): es un compendio exhaustivo y autorizado de genes humanos que está disponible y actualizado diariamente. Los resúmenes de referencia en OMIM contienen información sobre todos los trastornos mendelianos conocidos y más de 15.000 genes, centrándose en la relación entre el fenotipo y el genotipo. <https://www.omim.org/>

- ❖ Orphanet: es un recurso que reúne y mejora el conocimiento sobre las enfermedades raras para mejorar el diagnóstico, la atención y el tratamiento de los pacientes. Orphanet tiene como objetivo proporcionar información sobre enfermedades raras, y garantizar el acceso tanto a profesionales como pacientes y familiares. <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>

- ❖ GeneReviews: se trata de un recurso internacional que proporciona información clínicamente relevante sobre trastornos hereditarios en un formato estandarizado. Esta herramienta incluye información sobre el diagnóstico, la gestión y el asesoramiento genético. Cada capítulo en GeneReviews está escrito por uno o más expertos sobre la enfermedad específica y pasa por un riguroso proceso de edición y revisión por pares antes de publicarse. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/>

- ❖ PubMed: es un motor de búsqueda de libre acceso a la base de datos MEDLINE de citas y resúmenes de artículos de investigación biomédica.

MEDLINE tiene alrededor de 4800 revistas publicadas en Estados Unidos y en más de 70 países de todo el mundo desde 1966 hasta la actualidad.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Finalmente, se incluyeron un total de 128 genes asociados al desarrollo de fallo medular congénito descritos hasta junio de 2015 en las bases de datos mencionadas. La relación de los genes seleccionados se detalla en la tabla 4.1.

ENFERMEDAD	HERENCIA	GEN	LOCUS	OMIM
Anemia de Fanconi	AR	<i>FANCA/FAH</i>	16q24.3	607139
	XLR	<i>FANCB/FA2</i>	Xp22.2	300515
	AR	<i>FANCC/FA3</i>	9q22.3	613899
	AR	<i>FANCD1/BRCA2</i>	13q13.1	600185
	AR	<i>FANCD2/ FANCD</i>	3p25.3	613984
	AR	<i>FANCE/FACE</i>	6p21.3	613976
	AR	<i>FANCF/ FAF</i>	11p14	613897
	AR	<i>FANCG/XRCC9</i>	9p13	602956
	AR	<i>FANCI/KIAA1794</i>	15q25-q26	611360
	AR	<i>FANCI/BACH1</i>	17q23.2	605882
	AR	<i>FANCL/FAAP43</i>	2p16.1	608111
	AR	<i>FANCM/FAAP250</i>	14q21.3	609644
	AR	<i>FANCN/PALB2</i>	16p12.1	610355
	AR	<i>FANCO/RAD51C</i>	17q25.1	613390
	AR	<i>FANCP/SLX4</i>	16p13.3	613278
	AR	<i>FANCQ/ERCC4</i>	16p13.12	615272
	AD	<i>RAD51/RAD51A</i>	15q15.1	179617
	AR	<i>FANCS/BRCA1</i>	17q21	617883
Disqueratosis congénita	XLR	<i>DKC1</i>	Xq28	300126
	AD	<i>TERC</i>	3q26.3	602322
	AD, AR	<i>TERT</i>	5p15.53	187270
	AD	<i>TINF2</i>	14q11.2	604319
	AR	<i>NOP10/NOLA3</i>	15q14-q15	606471
	AR	<i>NHP2/NOLA2</i>	5q35.5	606470

	AR	<i>TCAB1/WRAP53</i>	17p13	612661
	HH	<i>RTEL1</i>	20q13.3	608833
	AD	<i>CTC1</i>	17p13.1	613129
	AR	<i>NHEJ1/XLF</i>	2q35	611290
Anemia de Diamond–Blackfan	AD	<i>RPS19</i>	19q13.2	603474
	AD	<i>RPS24</i>	10q22.3	602412
	AD	<i>RPS17</i>	15q25,2	612527
	AD	<i>RPL35A</i>	3q29	180468
	AD	<i>RPL5</i>	1p22.1	603634
	AD	<i>RPL11</i>	1p36.11	604175
	AD	<i>RPS7</i>	2p25.3	603658
	AD	<i>RPS10</i>	6p21.31	603632
	AD	<i>RPS26</i>	12q13.2	603701
	AD	<i>RPL26</i>	17p13.1	603704
	AD	<i>RPL15</i>	3p24.2	604174
	AD	<i>RPS29</i>	14q21.3	603633
	ND	<i>RPL31</i>	2q11.2	617415
	XLR	<i>GATA-1</i>	Xp11.23	305371
	ND	<i>RPL19</i>	17q12	180466
	AD	<i>RPL27</i>	17q21.31	607526
	AD	<i>RPS27</i>	1q21.3	603702
	AD	<i>RPS28</i>	19p13.2	603685
	XLR	<i>TSR2</i>	Xp11.22	300945
Síndrome de Shwachman–Diamond	AR	<i>SBDS</i>	7q11	607444
Neutropenia congénita grave	AR	<i>CSF3R</i>	1p34.3	138971
	AD	<i>ELANE/ELA2</i>	19p13.3	130130
	AD	<i>GFII</i>	1p22.1	600871
	AR	<i>HAX1</i>	1q21.3	605998
	AR	<i>G6PC3</i>	17q21.31	611045

	XLR	<i>WAS/SCNX</i>	Xp11.23	300392
	ND	<i>CXCR2</i>	2q35	146928
	AR	<i>JAGN1</i>	3p25.3	616012
	AR	<i>TCIRG-1</i>	11q13.2	604592
	AR	<i>VPS45</i>	1q21.2	610035
	AR	<i>CLPB</i>	11q37.4	616254
Trombocitopenia con ausencia de radio	AR	<i>RBM8A</i>	1q21.1	605313
Trombocitopenia amegacariocítica	AR	<i>MPL</i>	1q34.2	159530
Sinostosis radioulnar con trombocitopenia amegacariocítica	AD	<i>HOXA11</i>	7p15.2	142958
Disgenesia reticular	AR	<i>AK2</i>	1p35.1	103020
Síndrome WHIM	AD	<i>CXCR4</i>	2q22.1	162643
Glucogenosis tipo 1b	AR	<i>SLC37A4</i>	11q23.3	602671
Síndrome de Barth	XLR	<i>TAZ</i>	Xq28	300394
Cartílago pelo hipoplasia	AR	<i>RMRP</i>	9p13.3	157660
Síndrome de Chediak-Higashi	AR	<i>LYST</i>	1q42.3	606897
Síndrome de Griscelli	AR	<i>MYO5A</i>	15q21.2	160777
	AR	<i>RAB27A</i>	15q21.3	603868
Síndrome de Cohen	AR	<i>COH1/VPS13B</i>	8q22.2	607817
Inmunodeficiencia por defecto de la proteína MAPBP	AR	<i>MAPBPIP/LAMTOR</i> 2	1q22	610389
Síndrome de Hermansky-Pudlak	AR	<i>HPS1</i>	10q24.2	604982
	AR	<i>AP3B1</i>	5q14.1	603401
	AR	<i>HPS3</i>	3q24	606118
	AR	<i>HPS4</i>	22q12.1	606682
	AR	<i>HPS6</i>	10q24.32	607522
	AR	<i>DTNBP1</i>	6p22.3	607145

	AR	<i>BLOC1S3</i>	19q13.32	609762
	AR	<i>PLDN</i>	15q21.1	604310
Poiquilodermia y neutropenia	AR	<i>USB1</i>	16q21	613276
Síndrome de Wiskott-Aldrich tipo 2	AR	<i>WIPF1</i>	2q31.1	602357
Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth axonal tipo 2M	AD	<i>DYN2/DNM2</i>	19p13.2	602378
Síndrome de Wolcott-Rallison	AR	<i>EIF2AK3/PERK</i>	2p11.2	604032
Anemia megaloblástica respondedora a tiamina	AR	<i>SLC19A2</i>	1q24.2	603941
Anemia diseritropoyética congénita	AR	<i>CDANI</i>	15q15.2	607465
	AR	<i>SEC23B</i>	20p11.23	610512
Síndrome de Nijmegen	AR	<i>NBS1/NTN</i>	8q21.3	602667
Síndrome de Nijmegen like	AR	<i>RAD50</i>	5q31.1	604040
Síndrome de Bloom	AR	<i>RECQL3/BLM</i>	15q26.1	604610
Síndrome de Seckel	AR	<i>ATR</i>	3q23	601215
	AR	<i>RBBP8</i>	18q11.2	604124
	AR	<i>CENPJ</i>	13q12.12	609279
	AR	<i>CEP152</i>	15q21.1	613529
	AR	<i>CEP63/SCKL6</i>	3q22.2	614724
	AR	<i>NIN/SCKL7</i>	14q22.1	608684
	AR	<i>DNA2/DNA2L/hDNA2</i>	10q21.3	601810
Síndrome ligase IV	AR	<i>LIG4</i>	13q33.3	601837
Ataxia-telangiectasia	AR	<i>ATM</i>	11q22.3	607585
Ataxia-telangiectasia-like disorder	AR	<i>MRE11A</i>	11q21	600814

Síndrome de Werner	AR	<i>RECQL2/WRN</i>	8p12	604611
Síndrome de Roberts	AR	<i>ESCO2</i>	8p21.1	609353
Síndrome Warsaw	AR	<i>DDX11</i>	12p11.21	601150
Trombopatía familiar autosómica dominante	AD	<i>RUNX1/CBFA2</i>	21q22.12	151385
Síndrome fallo medular tipo 2	AR	<i>ERCC6L2</i>	9q22.32	615667
Anemias siderobásticas hereditarias	XLR	<i>ALAS2</i>	Xp11.21	301300
	AR	<i>SLC25A38</i>	3p22.1	610819
	AR	<i>GLRX5</i>	14q32.13	609588
	AR	<i>PUS1</i>	12q24.33	608109
	XLR	<i>ABCB7</i>	Xq13.3	300135
	AR	<i>TRNT1</i>	3p26.2	612907
Anemia microcítica con sobrecarga de hierro tipo 2	AD	<i>STEAP3</i>	2q14.2	609671
Thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome	AR	<i>SLC19A2</i>	1q24.2	603941
Mielodisplasia hereditaria	AD	<i>CEBPA</i>	19q13.11	116897
	AD	<i>GATA2</i>	3q21.3	137295
	AD	<i>SRP72</i>	4q12	602122
	AD	<i>DDX41</i>	5q35.3	608170
Trombopenias hereditarias				
Trombopenia tipo 2	AD	<i>ANKRD26</i>	10p12.1	610855
Síndrome plaquetas grises	AR	<i>NBEAL2</i>	3p21.31	614169
Enfermedades MYH9	AD	<i>MYH9</i>	22q12.3	160775
Síndrome de Upshaw Schulman	AR	<i>ADAMTS13</i>	9q34.2	604134
Trombopenia tipo 4	AD	<i>CYCS</i>	7p15.3	123970
E.von Willebrand con trombopenia	AD	<i>GP1BA</i>	17p13	606672

Macrotrombocitopenia relacionada con TUBB1	AD	<i>TUBB1</i>	20q13.32	612901
Trombocitopenia relacionada con ITGA2/ITGB3	AD	<i>ITGA2B</i>	17q21.31	607759
	AD	<i>ITGB3</i>	17q21.32	173470
Macrotrombocitopenia familiar	ND	<i>MASTL</i>	10p12.1	608221
Trombopenia tipo 5	AD	<i>ETV6</i>	12p13.2	600618

Tabla 4.1: Listado de genes incluidos en el panel de secuenciación masiva.

4.2.3 Técnicas moleculares empleadas

4.2.3.1 PCR convencional (Reacción en cadena de la polimerasa)

La PCR, es una técnica de biología molecular descrita en 1985 por Kary Mullis. Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN. Para realizar la técnica se necesitan: el ADN molde que se quiere estudiar, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), dos cebadores (oligonucleótidos) complementarios a una de las dos hebras del ADN, un tampón que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa, iones de magnesio (Mg^{2+}), agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$), como cofactor de la polimerasa, y ADN polimerasa (*Taq* polimerasa).

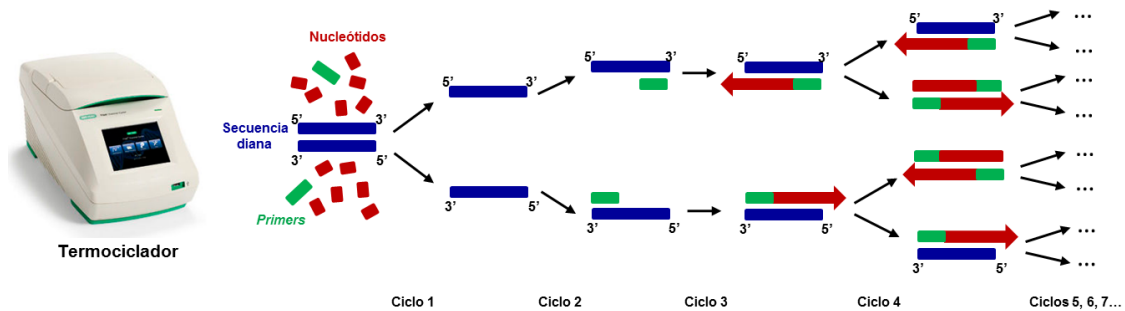


Imagen 4.1: Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa

4.2.3.2 Secuenciación automática clásica o Sanger

Este método de secuenciación de ADN fue diseñado por Sanger, Nicklen y Coulson en 1977 y se conoce como método de los terminadores de cadena o dideoxi. En este caso se marcan los dideoxis con un compuesto fluorescente. Los productos de la reacción se detectan directamente durante la electroforesis ya que al pasar por delante del láser se excitan los fluorocromos permitiendo detectar la fluorescencia emitida. Para llevar a cabo esta técnica es necesario hacer una PCR clásica con los cebadores específicos de cada fragmento de ADN que se quiere amplificar.

El producto de PCR se procesa por el sistema *EZNA* (método de purificación mediante columnas, *Omega Biotek*, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Usando como molde el producto de PCR amplificado se lleva a cabo la reacción de secuenciación, donde se añadirá una combinación de ddNTPs así como de los dNTPs de la reacción de PCR clásica. En el laboratorio se usa un reactivo comercial de *Applied Biosystems* llamado *dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI Prism, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)*. Tras la reacción de secuenciación el producto se purifica mediante columnas *Centri-Sep™* (*Centri-Sep™ Columns, Applied Biosystems*) según las instrucciones del fabricante. Una vez se obtiene el producto purificado se analiza en el secuenciador automático *ABI Prism 3100 genetic analyzer*. Esta técnica permite leer la secuencia de una región concreta del genoma y de este modo ver cuál es el cambio exacto a nivel de nucleótido.

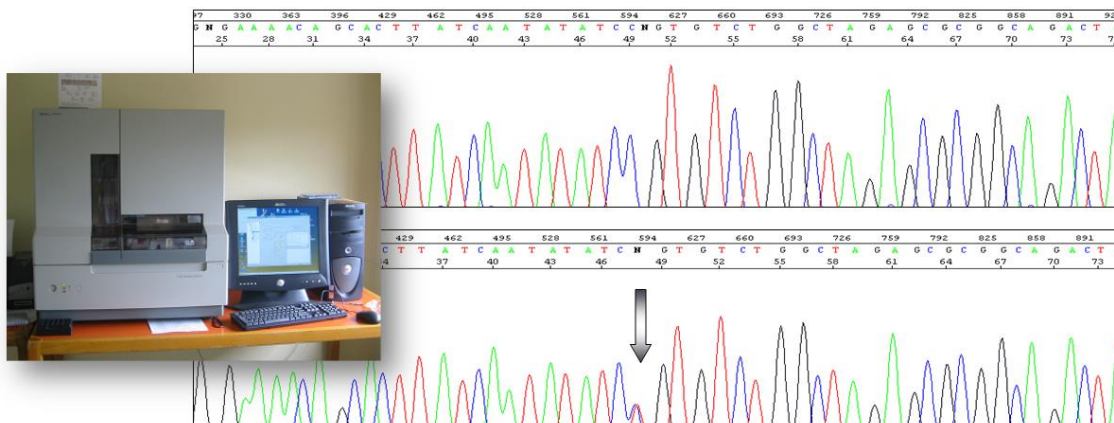


Imagen 4.2: Imagen de secuenciación Sanger

4.2.3.3 MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

La técnica de MLPA, descrita por Schouten y colaboradores en el año 2002, permite la cuantificación relativa de hasta 46 secuencias distintas de ADN en un rápido, único y sencillo experimento para el que se requieren 20 ng de ADN como muestra.

Esta técnica se basa en la amplificación de sondas específicas previamente hibridadas a las secuencias diana del ADN. Cada sonda consiste en dos oligonucleótidos, uno sintético y otro derivado del fago M13, que hibridan en zonas adyacentes dentro de la secuencia diana (50 a 70 nucleótidos de longitud) del ADN. Una vez que estas sondas hibridadas son ligadas, se procede a su amplificación mediante PCR con una única pareja de cebadores (todas las sondas contienen secuencias idénticas en sus extremos). Cada sonda da entonces lugar a un producto de amplificado de tamaño único entre 130 y 480 pb (la diferencia de longitud entre dos sondas es de 6-8 pb, aportada por la región de longitud variable del oligo M13). Como la cantidad de cada sonda que es amplificada depende de la cantidad de secuencias diana presentes en la muestra de ADN, es posible la cuantificación relativa de dichas secuencias y por tanto, la detección de cambios en el número de copia de éstas como deleciones o duplicaciones. No obstante, mediante el empleo de esta técnica se puede sospechar la presencia de aneuploidía si ambas sondas de cada brazo cromosómico aparecen duplicadas (trisomía) o delecionadas (monosomía).

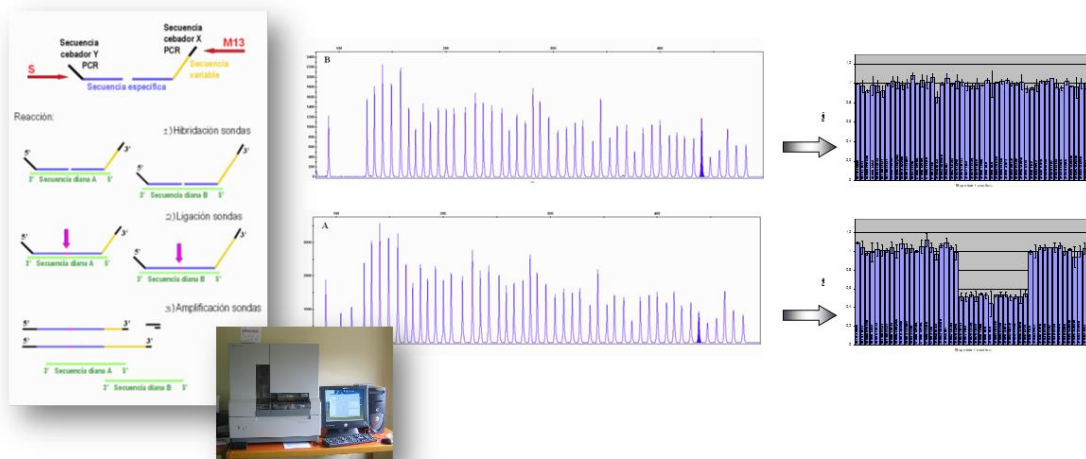


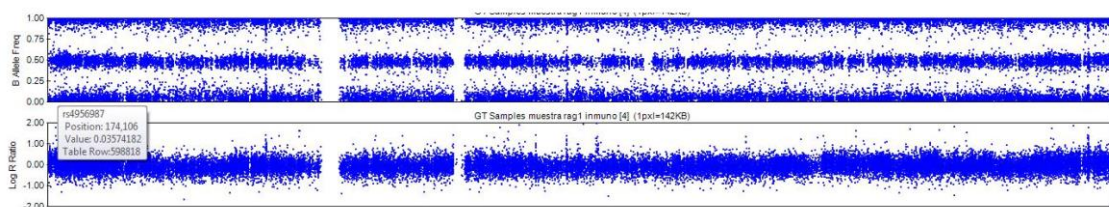
Imagen 4.3: Imagen de la técnica MPLA

4.2.3.4 Microarrays de SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Inicialmente descritos en el año 2000 por Mei y colaboradores, son una variante de los arrays de oligonucleótidos diseñados para contener variantes tipo SNP. Este tipo de arrays son capaces de identificar cualquier desequilibrio (aneuploidía, delección, duplicación) de los *loci* representados en el microarray pero, además, están diseñados para detectar, en una muestra problema, la presencia o ausencia de un determinado SNP. Por tanto, estos arrays permiten conocer simultáneamente la secuencia de cientos de miles (con frecuencia más de un millón) de variantes génicas presentes en la muestra. Como consecuencia, esto permite reconocer el origen parental de cada copia y detectar disomías uniparentales y pérdidas de heterocigosidad (LOH, loss of heterozygosity).

Los microarrays de SNP ofrecen una gran ventaja respecto a las pruebas genéticas empleadas hasta ahora para determinar el genotipo de una serie de marcadores: es una prueba global, que no selecciona previamente los genes a estudiar sino que realiza un escaneo general del genoma en busca de genotipos de interés. El espaciamiento de SNP en algunos formatos (<500.000 SNP) supone que no se pueda llegar a identificar algunas deleciones muy pequeñas aunque, debido a la mejora en la tecnología, estas limitaciones podrían ser corregidas en el futuro.

Array normal:



Pérdida de heterocigosidad (LOH):

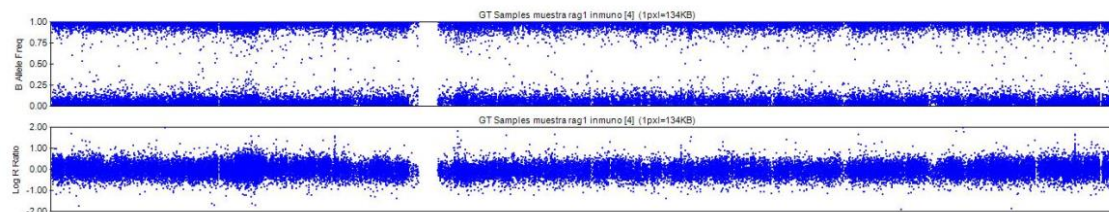


Imagen 4.4: Ejemplos de array normal y pérdida de heterocigosidad

4.2.3.5 Secuenciación masiva

Como ya se ha comentado, la NGS es una nueva tecnología en el campo de la genética que está suponiendo una revolución en todos los ámbitos de la biología y medicina que permite secuenciar de forma paralela millones de fragmentos de ADN a un precio cada vez más reducido. Tiene además el potencial de detectar numerosos tipos de variación genómica en un único experimento, incluyendo variantes de nucleótido único o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones, y según el diseño, también de variantes estructurales equilibradas (inversiones y translocaciones) o desequilibradas (deleciones o duplicaciones). La secuenciación masiva, debido a su elevada sensibilidad, también permite identificar mutaciones presentes en un porcentaje muy pequeño de células (mosaicismo y/o contaminaciones).

El auge de la NGS ha llegado acompañado de una gran generación de información y datos que debido a su volumen, se han tenido que desarrollar plataformas específicas para almacenar y gestionar el volumen que se genera. Esto ha dado lugar a la incorporación de un nuevo perfil de profesional dentro del ámbito biosanitario, el bioinformático. Los estudios de secuenciación masiva requieren de recursos de computación que ejecuten los algoritmos de análisis bioinformático y almacenamiento en disco de los ficheros generados en estos estudios y sujetos a la Ley 41/2002 que obliga a su custodia legal por un período mínimo de cinco años.

4.2.3.5.1 Método de secuenciación masiva

En cuanto a la técnica de NGS, una vez extraído el ADN y preparadas las muestras, se procede a la secuenciación de las mismas mediante el instrumento NextSeq 500 (Illumina, Inc. EE. UU.) Para ello se utilizó v2, de acuerdo con el protocolo operativo estándar. El sistema NextSeq® de Illumina lidera actualmente la tecnología NGS mediante lecturas cortas, lo que se debe a la robustez de su tecnología mediante secuenciación por síntesis.

Esta secuenciación se basa en la incorporación de nucleótidos marcados con terminadores reversibles, de manera que en cada ciclo de ligación solamente uno de los cuatro nucleótidos posibles se une de forma complementaria al ADN molde, emitiendo una señal luminosa que es captada por un sistema óptico altamente sensible (imagen 4.5).

Posteriormente, el terminador se elimina para permitir la incorporación del siguiente nucleótido en ciclos sucesivos de secuenciación. En este sentido, el fundamento de la técnica es muy similar al de la secuenciación Sanger, ya que se utilizan nucleótidos marcados con distintos fluorocromos, dándonos la secuencia final según la fluorescencia que marquen.

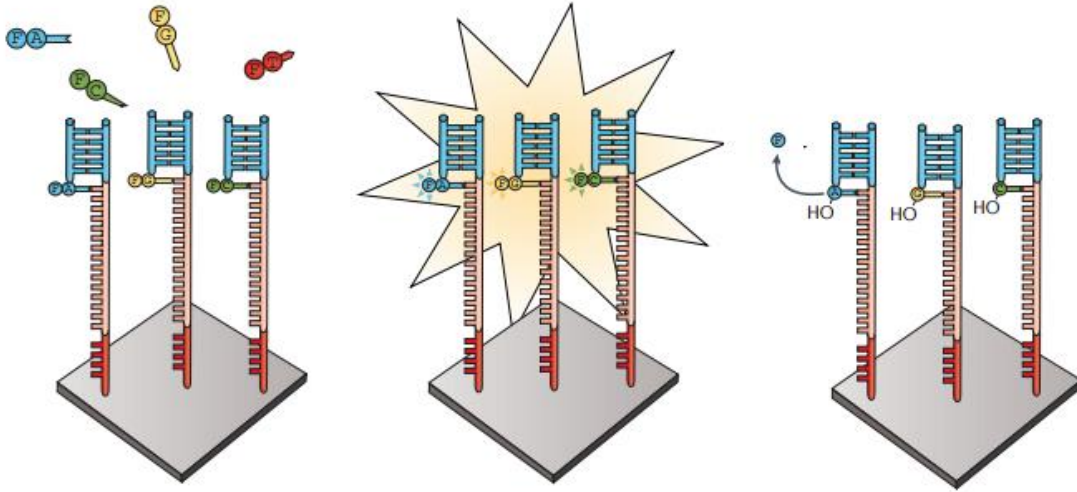


Imagen 4.5: Secuenciación por síntesis (Illumina).

Cada nucleótido está bloqueado de forma reversible con un grupo 3'-O-azidometil y está etiquetado con un fluoróforo específico para cada una de las bases. Durante cada ciclo de secuenciación, los fragmentos incorporan sólo un nucleótido debido a que el grupo -OH en el extremo 3' previene la incorporación de otros nucleótidos. Una vez añadida la base, aquéllas no incorporadas son lavadas y acto seguido se captura la imagen que permitirá identificar el nucleótido añadido según el fluoróforo del mismo. Tras esto, el fluoróforo es escindido y el extremo 3'-OH se regenera con un agente reductor, permitiendo así que el ciclo de adición de un nucleótido, elongación y escisión pueda comenzar de nuevo. (Modificada de Goodwin, y cols., 2016).

4.2.4 Diseño del panel

Este panel fue diseñado con el software NimbleDesign (<https://design.nimblegen.com>, Roche NimbleGen, Inc. EE. UU.): HG19 NCBI Build 37.1 / GRCh37, bases objetivo cubiertas 99,6% y tamaño 370,730 Kb.

Design Information

Customer Design Identifier:

MBFS_v1-1

Organism:

Homo sapiens

Final Design Identifier:

150608_HG19_MBFS_v1-1_EZ_HX3

Genome Build:

HG19/GRCh37

Application:

SeqCap EZ

Format:

SeqCap EZ Choice

Description:

Consolidation Report - Overlapping Regions

Initial Regions Count:

1,976

Final Regions Count:

1,970

Initial Sequence Total:

359,509

Final Sequence Total:

370,730

Parameters

Preferred Close Matches:

3

Maximum Close Matches:

20

Statistics:

Target Bases Covered:

363,678

369,314

% Target Bases Covered:

98.1

99.6

Target Bases Not Covered:

7,052

1,416

Due to Ns

0

0

Due to Repeats

1,685

1,199

% Target Bases Not Covered:

1.9

0.4

Due to Ns

0

0

Due to Repeats

0.5

0.3

Related Deliverables

Coverage Summary:

MBFS_v1-1_coverage_summary.txt

Region by Region Coverage:

MBFS_v1-1_coverage.zip

Primary Targets BED:

MBFS_v1-1_primary_targets.zip

Capture Targets BED:

MBFS_v1-1_capture_targets.zip

Predicted Uncovered Targets BED:

MBFS_v1-1_predicted_uncovered_targets.zip

4.2.5 Análisis bioinformático

El análisis bioinformático fue realizado por la Unidad de Bioinformática Clínica del centro INGEMM. Para ello se utilizaron los softwares: trimmomatic-0.32, bowtie2-align versión 2.1.0, picard-tools 1.106, samtools Version.0.1.1-44428cd, bedtools v2.18.1, GenomeAnalysisTK versión 3.3-0. Bases de datos: dbNSFP versión 3.0, dbSNP v138, ClinVar fecha 20140703, SnpE 4.11, Exac r0.3, SIFT ensembl 66, Polyphen-2 v2.2.2, MutationAssessor, release 2, FATHMM, v2.3, CADD, v1.3 y dbSNV1.1.

4.2.5.1.1 Preprocesamiento de datos

El análisis de los datos consistió, en primer lugar, en transformar los archivos bcl del secuenciador NextSeq 500 en archivos fastq utilizando la herramienta de Illumina des-multiplexing bcl2fastq. Luego, las secuencias fueron mapeadas con el genoma humano de referencia UCSC hg19 (versión de febrero de 2009) con Bowtie2 ¹⁴⁶.

Las lecturas duplicadas se eliminaron utilizando la función Picard RemoveDuplicated ¹⁴⁷. El realineamiento y el recalibrado de los parámetros de calidad (las funciones RealignerTargetCreator e IndelRealigner de GATK¹⁴⁸) se realizaron posteriormente siguiendo las guías propuestas por GATK.

El “*variant calling*” se realizó sobre los archivos BAM realineados y recalibrados. Las variantes caracterizadas fueron el resultado de un criterio de consenso entre los “*variant callers*” UnifiedGenotyper y HaplotypeCaller.

Los archivos vcf se filtraron y anotaron con Annovar¹⁴⁹. Además, el archivo vcf fue enriquecido con herramientas de predicción de la patogenicidad proporcionadas por el proxy dbNSFP ¹⁵⁰(versión 3.0) para generar datos de población (datos europeos no finlandeses Exac¹⁵¹ y servidores de variantes del español CIBERER¹⁴⁷).

4.2.5.1.2 Control de calidad

Paralelamente al proceso de análisis, se realizó un control de calidad de las muestras secuenciadas valorando el género cromosómico, la calidad de la amplificación de la biblioteca y de las variantes.

El género cromosómico se detectó mediante el cálculo de la dosis de cromosomas sexuales en los marcadores incluidos para el sexado en el diseño del panel. Además, las muestras fueron marcadas para determinar las relaciones entre ellos.

RESUMEN PROTOCOLO DE LABORATORIO Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

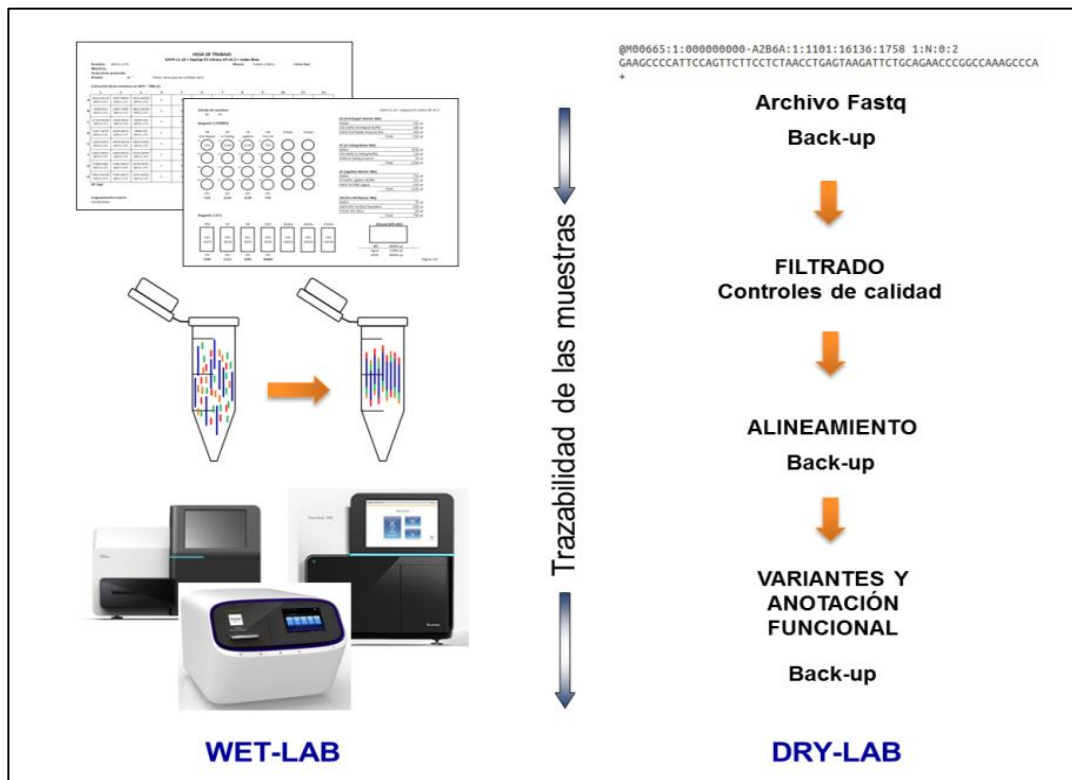


Imagen 4.7: Figura en la que se puede ver de manera esquemática el proceso de laboratorio en el lado izquierdo de la imagen (denominado “wet-lab”) y el procedimiento de análisis bioinformático descrito a la derecha (denominado “dry-lab”)

4.2.6 Análisis de variantes

4.2.6.1 Filtrado de variantes

Una vez secuenciada la muestra y habiendo sido procesados los datos por el equipo de bioinformática, se procedió al análisis de las variantes detectadas en cada paciente para su clasificación. El método de filtrado de variantes se realizó siguiendo las pautas del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG, del inglés *American College of Medical Genetics and Genomics*)¹⁵² y de las publicaciones realizadas previamente por grupos internacionales que investigan en este campo^{138 106 141}. En la figura 4.2 se desarrolla el proceso de filtrado de variantes.

En primer lugar, se localizan aquellas mutaciones que han sido descritas en las diferentes bases de datos públicas que se indican en la tabla 4.2.

SNP effect 4.0	http://snpeffect.switchlab.org
The National Center for Biotechnology Information's ClinVar database	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar
The Leiden Open Variation Database (LOVD)	http://databases.lovd.nl/shared/genes
Fanconi Anemia Mutation database	http://www.rockefeller.edu/fanconi/genes
The Telomerase Database	http://telomerase.asu.edu/diseases.html

Tabla 4.2: Bases de datos públicas que han sido consultadas en el análisis de variantes.

Las variantes se definieron como 'causales' si habían sido descritas como causantes de enfermedades en las bases mencionadas. Las variantes se consideraron "no causantes de enfermedad" si habían sido descritas como polimorfismos.

Por tanto, aquellas variantes no descritas ni como polimorfismos ni como causantes de enfermedad se clasificaron como “variantes no conocidas”. Una vez detectadas estas variantes se analizaron los datos de frecuencia alélica menor (del inglés “minor allele frequency”, MAF), la conservación de los aminoácidos, predictores de

patogenicidad o modelos “*in silico*” y el patrón de herencia de la enfermedad en cuestión. En función de estos parámetros, las “variantes no conocidas” se clasificaron como candidatas o no candidatas. Las variantes consideradas como candidatas, debían cumplir los siguientes requisitos¹³⁸:

Frecuencia alélica detectada coincidente con el patrón de herencia asociado a la enfermedad de sospecha	MAF con valor inferior a 0.001
Los aminoácidos conservados se ven afectados	Resultado patogénico de al menos 4 predictores del análisis “ <i>in silico</i> ” realizado por los siguientes programas: PolyPhen2, SIFT, CADD, Mutation Assesor, FATHMM, VEST, ada score y rf score.

Aquellas que no cumplieron con los criterios descritos anteriormente, no se consideraron candidatas a ser causantes de enfermedad.

4.2.6.2 Clasificación de las variantes

Una vez detectadas aquellas variantes candidatas que podrían ser causales de enfermedad, fueron clasificadas en 5 grupos: patogénica, probablemente patogénica, benigna, probablemente benigna y de significado incierto. Para ello se siguieron las recomendaciones de la ACMG que utiliza dos conjuntos de criterios para ponderar el impacto de la variante: uno para la clasificación de variantes patogénicas o probablemente patogénicas y otro para clasificación de variantes benignas o probablemente benignas¹⁵². Cada criterio patogénico se pondera como muy fuerte (PVS1), fuerte (PS1-4); moderado (PM1-6), o de apoyo (PP1-5), y cada criterio benigno se pondera como autónomo (BA1), fuerte (BS1-4), o de apoyo (BP1-6). Dicha ponderación se detalla en las tablas 4.3 y 4.4.

Muy fuerte	PVS1: Variante nula (<i>nonsense, frameshift, canonical ± 1 or 2 splice sites, initiation codon, single or multiexon deletion</i>) en un gen donde la pérdida de funcionalidad es un mecanismo conocido de la enfermedad
Fuerte	<p>PS1: Mismo cambio de aminoácidos que una variante patogénica previamente establecida, independientemente del cambio de nucleótidos</p> <p>PS2: De <i>novo</i> (confirmado por maternidad y paternidad) en un paciente con la enfermedad y sin antecedentes familiares</p> <p>PS3: Estudios funcionales bien establecidos in vitro o in vivo que apoyan un efecto perjudicial sobre el gen</p> <p>PS4: La prevalencia de la variante en individuos afectos aumenta significativamente en comparación con la prevalencia en controles</p>
Moderado	<p>PM1: localizado en un punto mutacional y/o dominio funcional crítico y bien establecido sin variación benigna</p> <p>PM2: Ausente de los controles (o a una frecuencia extremadamente baja si es recesivo)</p> <p>PM3: Para trastornos recesivos, detectados en trans con una variante patogénica</p> <p>PM4: La longitud de la proteína cambia como resultado de delecciones/inserciones “<i>in frame</i>” en una región sin repetición o variantes de stop-loss</p> <p>PM5: Nuevo cambio <i>missense</i> en un residuo de aminoácido en el que se ha descrito previamente un cambio patogénico <i>missense</i> diferente.</p> <p>PM6: De novo, pero sin confirmación de paternidad y maternidad</p>
De apoyo	<p>PP1: Cosegregación con enfermedad en múltiples miembros de la familia afectada en un gen conocido por ser causante de la enfermedad</p> <p>PP2: Variante <i>missense</i> en un gen que tiene una baja tasa de variantes benignas <i>missense</i> y en la cual las variantes tipo <i>missense</i> son un mecanismo común de enfermedad</p> <p>PP3: Varias líneas de evidencia computacional respaldan un efecto nocivo sobre el gen o producto del gen</p> <p>PP4: El fenotipo o la historia familiar del paciente es altamente específico para una enfermedad con una sola etiología genética</p> <p>PP5: variante considerada patogénica por una fuente fiable, pero no es posible verificarlo con pruebas de laboratorio mediante una evaluación independiente</p>

Tabla 4.3: Criterios para clasificar las variantes patogénicas

Autónomo	BA1: La frecuencia alélica es >5% en Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, o Exome Aggregation Consortium
Fuerte	<p>BS1: La frecuencia alélica de lo esperado para el trastorno</p> <p>BS2: Observado en un individuo adulto sano para un trastorno recesivo (homocigoto), dominante (heterocigoto) o ligado a X (hemocigoto), con una penetrancia completa esperable a una edad temprana</p> <p>BS3: Estudios funcionales bien establecidos in vitro o in vivo no muestran ningún efecto perjudicial sobre la función proteínica</p> <p>BS4: Falta de segregación en los miembros afectados de una familia</p>
De apoyo	<p>BP1: Variante <i>missense</i> en un gen para el cual se sabe que las variantes principalmente truncadoras causan enfermedades</p> <p>BP2: Observado en <i>trans</i> con una variante patogénica para un gen/ trastorno dominante con penetrancia completa u observado en <i>cis</i> con una variante patogénica en cualquier patrón de herencia</p> <p>BP3: Inserciones/deleciones <i>in frame</i> en una región repetitiva sin una función conocida</p> <p>BP4: Múltiples líneas de evidencia computacional sugieren que no hay impacto en el gen o producto</p> <p>BP5: Variante encontrada en un caso con una base molecular alternativa para la enfermedad</p> <p>BP6: Variante considerada benigna por una fuente fiable, pero no es posible verificarlo con pruebas de laboratorio mediante una evaluación independiente.</p> <p>BP7: Una variante sinónima (silenciosa) para la que los algoritmos de predicción de <i>splicing</i> no predicen ningún impacto en la secuencia ni la creación de un nuevo sitio de <i>splicing</i> Y el nucleótido no está conservado</p>

Tabla 4.4: Criterios para clasificar las variantes benignas

Según la ponderación de cada variante, se clasificaron tal y como se muestra en la tabla 4.5:

Patogénica	(i) 1 Muy fuerte (PVS1) Y (a) ≥ 1 Fuerte (PS1-PS4) O (b) ≥ 2 Moderado (PM1-PM6) O (c) 1 moderado (PM1-PM6) y 1 de apoyo (PP1-PP5) O (d) ≥ 2 Soporte (PP1-PP5) (ii) ≥ 2 fuerte (PS1-PS4) O (iii) 1 fuerte (PS1-PS4) Y (a) ≥ 3 Moderado (PM1-PM6) O (b) 2 Moderado (PM1-PM6) Y ≥ 2 Soporte (PP1-PP5) O (c) 1 Moderado (PM1-PM6) Y ≥ 4 de apoyo (PP1-PP5)
Probablemente patogénica	(i) 1 Muy fuerte (PVS1) Y 1 moderado (PM1-PM6) O (ii) 1 fuerte (PS1-PS4) Y 1-2 moderada (PM1-PM6) O (iii) 1 fuerte (PS1-PS4) Y ≥ 2 de apoyo (PP1-PP5) O (iv) ≥ 3 Moderado (PM1-PM6) O (v) 2 Moderado (PM1-PM6) Y ≥ 2 de apoyo (PP1-PP5) O (vi) 1 Moderado (PM1-PM6) Y ≥ 4 de apoyo (PP1-PP5)
Benigna	(i) 1 Independiente (BA1) O (ii) ≥ 2 Fuerte (BS1-BS4)
Probablemente benigna	(i) 1 fuerte (BS1-BS4) y 1 de apoyo (BP1-BP7) O (ii) ≥ 2 Apoyo (BP1-BP7)
Significado incierto	(i) No se cumplen otros criterios mostrados anteriormente O (ii) los criterios para benignos y patogénicos son contradictorios

Tabla 4.5: Clasificación de cada variante en función de la ponderación según ACMG.

En el anexo IV se adjuntan los criterios para la clasificación de variantes según ACMG en el formato original.

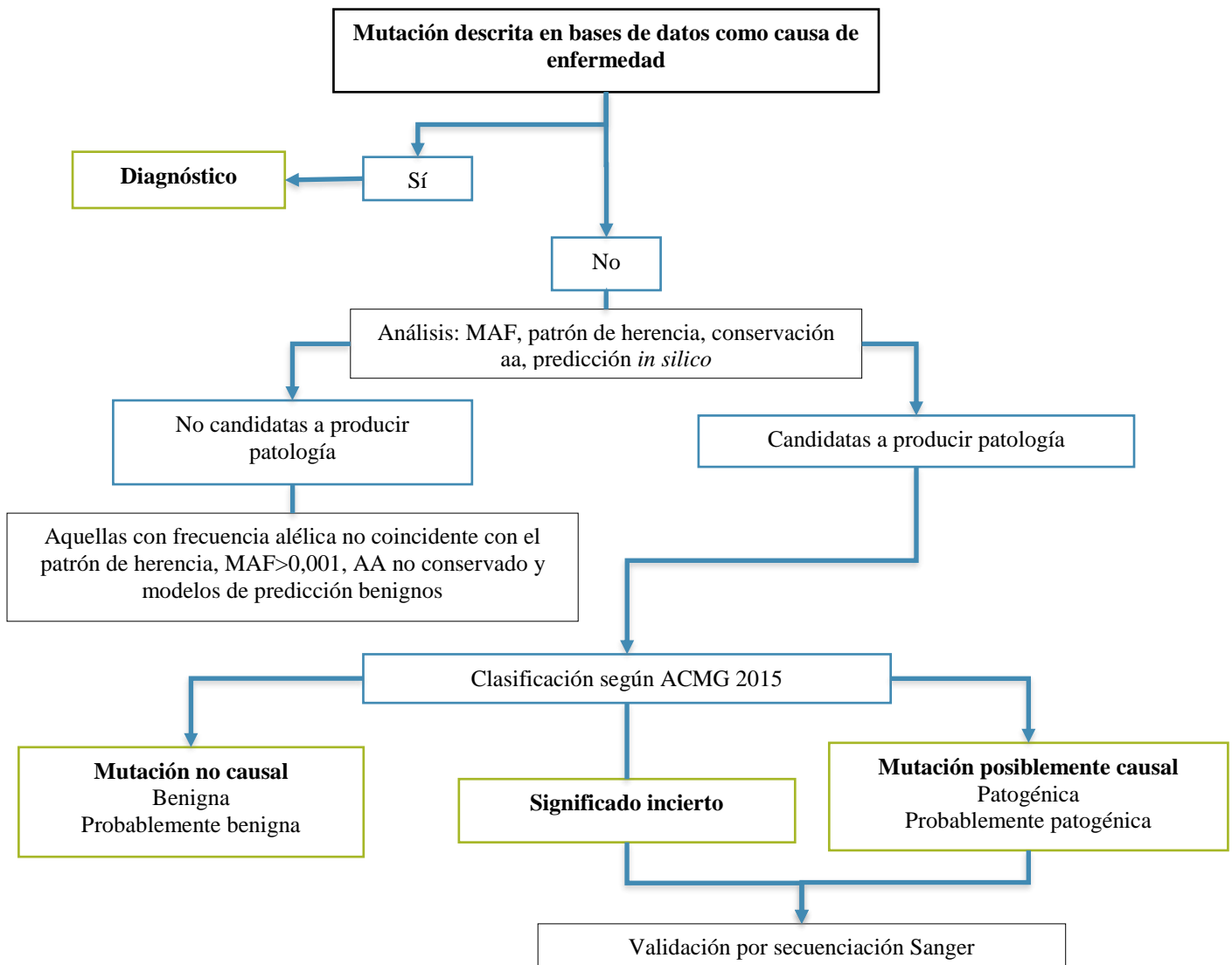


Figura 4.2: Algoritmo usado para el filtrado de variantes

4.2.7 Análisis del rendimiento del panel

El análisis del rendimiento del panel se ha realizado mediante la evaluación de los parámetros de calidad de las muestras procesadas. La obtención de datos a partir de secuenciación NGS implica varias etapas y métodos de análisis, cada uno de los cuales puede influir en la calidad de los resultados que se generan (figura 4.3).

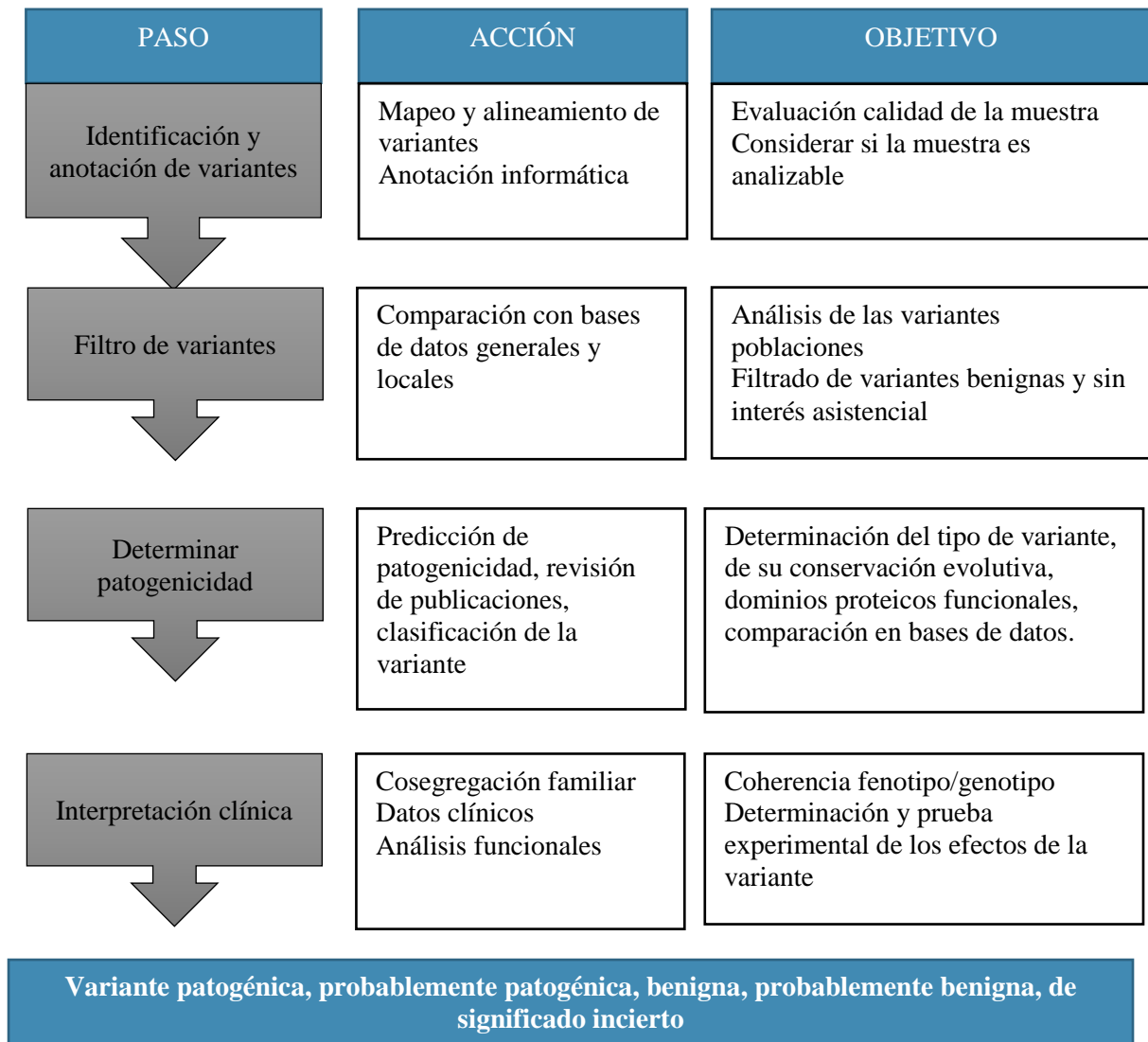


Figura 4.3: Pasos, acción y objetivos en el procedimiento de identificación y clasificación de variantes.

Para asegurar la calidad del procedimiento, es fundamental proporcionar una serie de parámetros que reflejen las limitaciones del estudio. A continuación, se definen los principales parámetros necesarios para evaluar el rendimiento de la herramienta diagnóstica:

a) Cobertura: se trata de la cantidad expresada en porcentaje de secuencia de interés de un gen, conjunto de genes (paneles) o de la totalidad de las regiones codificantes de los genes (exoma), que está representado en la región de captura o región a analizar. Las técnicas de captura o de amplificación de las secuencias, así como la propia secuenciación, pueden provocar que alguna región concreta no se secuencie completamente, lo que daría lugar a que se pudiera perder información de una o varias regiones. En este trabajo se consideraron como aptas coberturas superiores al 80%.

b) Profundidad: número de veces que cada base del genoma está presenta en las lecturas (*reads*) de secuenciación obtenidas. Este valor se denomina profundidad de cobertura (*depth of coverage* o *coverage*) y es uno de los factores determinantes para evaluar la fiabilidad del nucleótido asignado a esa posición del genoma. La profundidad de secuencia, o denominado también profundidad de cobertura, se refiere al número de veces que se ha leído la misma región del genoma. Así, es habitual generar una cantidad de datos que permiten leer cada base entre 20 y 100 veces, de tal forma que si hay una mutación, varias de esas lecturas contendrán la misma mutación, a diferencia de si hay un error de secuenciación, en cuyo caso la probabilidad de que haya más de una lectura con el mismo error es muy baja. En este trabajo, la profundidad de cobertura mínima se estableció en 20x.

c) Sensibilidad: es la capacidad de una técnica para identificar variantes/mutaciones que están presentes en la muestra, de tal forma que si un paciente tiene una mutación, la sensibilidad refleja cuál es la capacidad de la técnica para detectarla. Aunque idealmente sería deseable tener una sensibilidad del 100%, en la práctica este dato puede ser menor. Influyen en la sensibilidad una cobertura o profundidad insuficientes, el gen y la mutación en cuestión o su presencia en la totalidad de las células o en mosaicismo, así como las características de la muestra. Para el análisis de sensibilidad, se

incluyeron controles positivos y se analizó la detección de los mismos mediante el panel de genes diseñado.

d) Especificidad: este parámetro refleja la fiabilidad de las variantes identificadas y se define como el porcentaje de variantes génicas que la técnica detecta y que están realmente presentes en la muestra (sin ser falsos positivos). Es deseable que la especificidad de una prueba diagnóstica sea lo más próximo al 100% posible, lo que minimiza el número de falsos positivos. Para el análisis de la especificidad, se realizó la confirmación mediante Sanger de las mutaciones detectadas.

5. RESULTADOS

5.1 Características de los pacientes

Se incluyeron un total de 130 pacientes remitidos desde 30 hospitales con sospecha de fallo medular congénito entre junio de 2015 y mayo de 2017. La serie estaba compuesta por 72 hombres y 58 mujeres con una mediana de edad de 7 años (0-43 años).

Se recogieron los motivos del estudio indicados por los médicos que remitieron las muestras, siendo el más frecuente la sospecha de Anemia de Fanconi (26), seguido de eritroblastopenia congénita (25), fallo medular (21), trombopenia (18), neutropenia (11), disqueratosis (10), síndrome Shwachman-Diamond (7), pancitopenia (2), trombopenia amegacariocítica congénita (2), mielodisplasia hereditaria (1), hipoplasia medular (1), bicitopenia (3), anemia diseritropoyética (1), anemia (1), neutropenia e hipopigmentación (1).

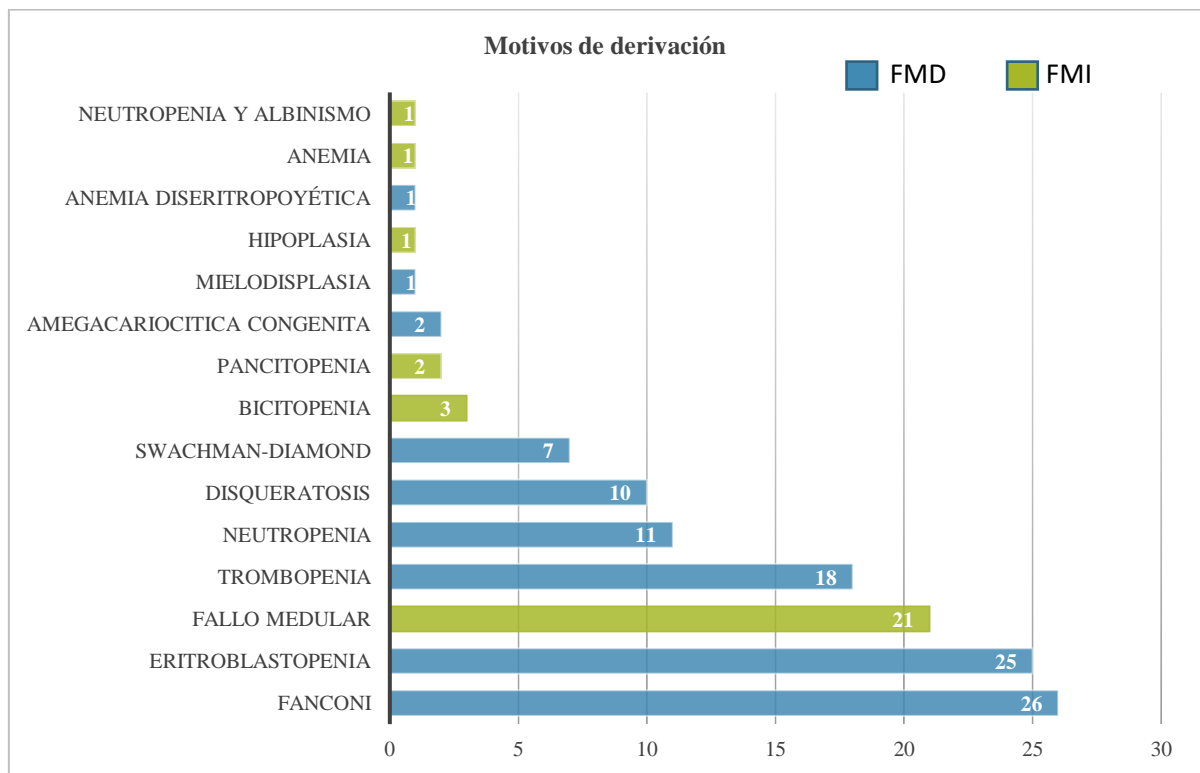


Gráfico 5.1: Distribución de pacientes según motivo de derivación

Los pacientes incluidos se dividieron en distintos grupos en función del motivo de derivación. El primer grupo, denominado “Fallo medular definido” (FMD) estaba compuesto por aquellos pacientes remitidos por anemia de Fanconi, eritroblastopenia, disqueratosis congénita, síndrome de Shwachman-Diamond, trombopenia amegacariocítica congénita, mielodisplasia hereditaria, anemia diseritropoyética congénita, neutropenia congénita grave y trombopenia. El resto de los pacientes que no pertenecían a ninguno de los grupos anteriormente mencionados, se incluyeron en el grupo de “Fallo medular indefinido” (FMI). De los 130 pacientes, 101 (77%) se clasificaron dentro del grupo FMD y 29 (23%) en el grupo de FMI.

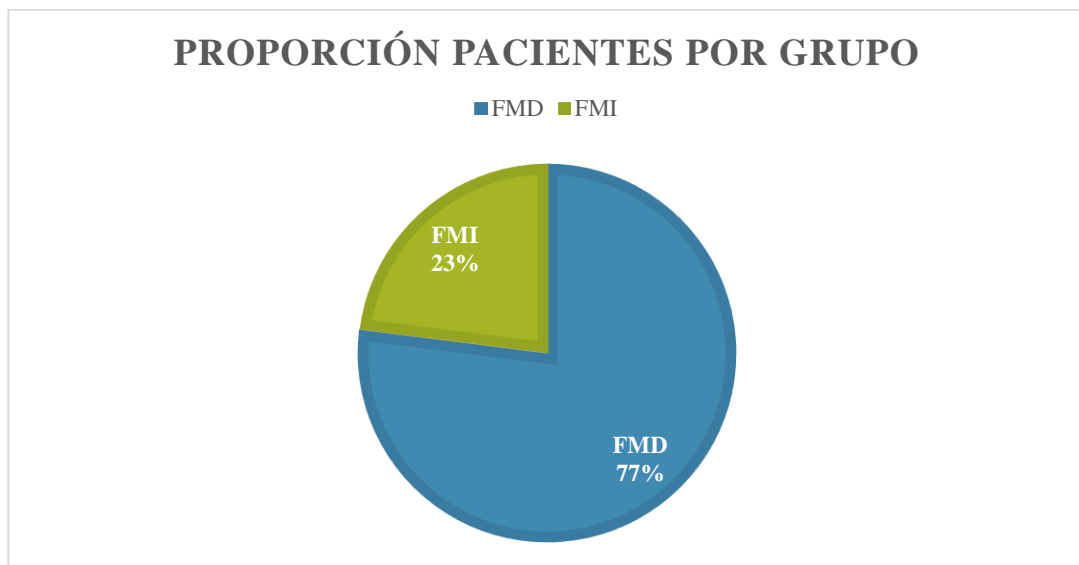


Gráfico 5.2: Proporción de los pacientes incluidos en el estudio según el grupo al que pertenecen.

5.1.1 Distribución de pacientes grupo FMD

Dentro del grupo denominado FMD, compuesto por 101 pacientes, los motivos de derivación más frecuentes correspondieron a anemia de Fanconi y eritroblastopenia (gráfico 5.3), englobando así más de la mitad de los pacientes incluidos en dicho grupo.

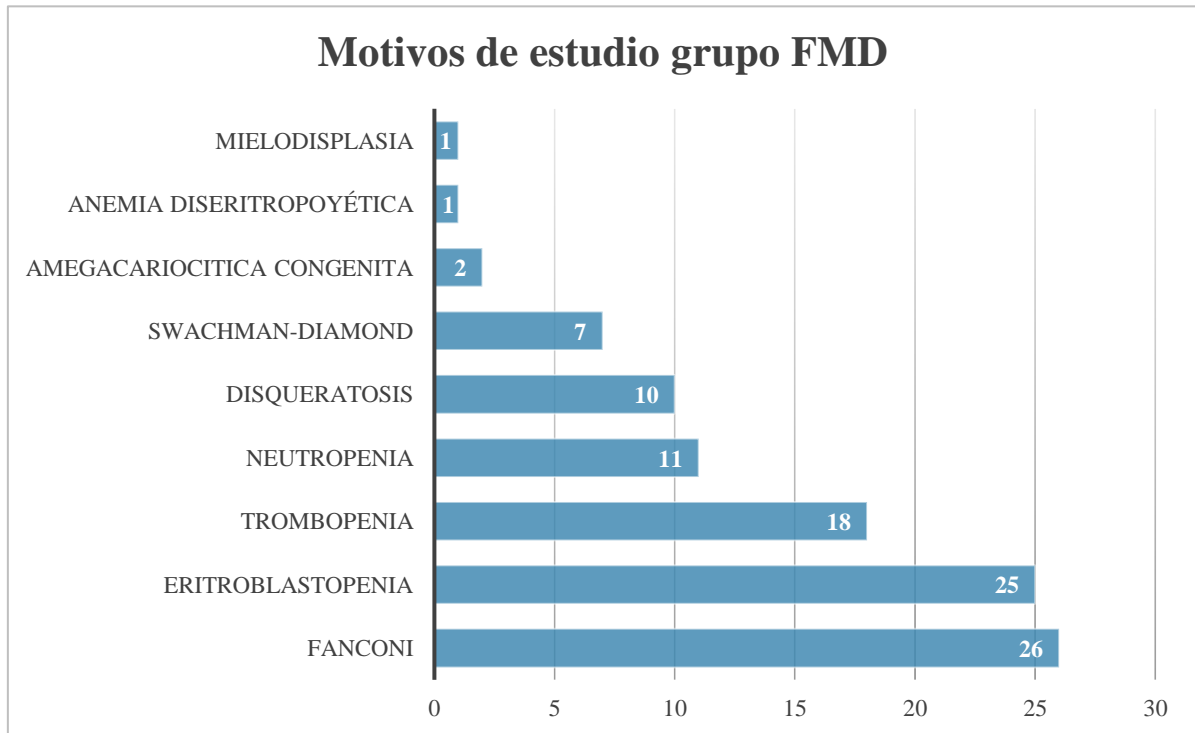


Gráfico 5.3: Distribución de pacientes incluidos en el grupo FMD

5.1.2 Distribución de pacientes grupo FMI

De los 29 pacientes que se incluyeron en el grupo FMI, el 73% (21) habían sido remitidos por sospecha de fallo medular congénito sin características clínicas típicas asociadas a ningún síndrome concreto. Los 8 pacientes restantes fueron remitidos por motivos muy heterogéneos: 3 fueron por bicitopenia, 2 por pancitopenia y los 3 pacientes restantes por anemia inespecífica, hipoplasia medular y albinismo asociado a neutropenia.

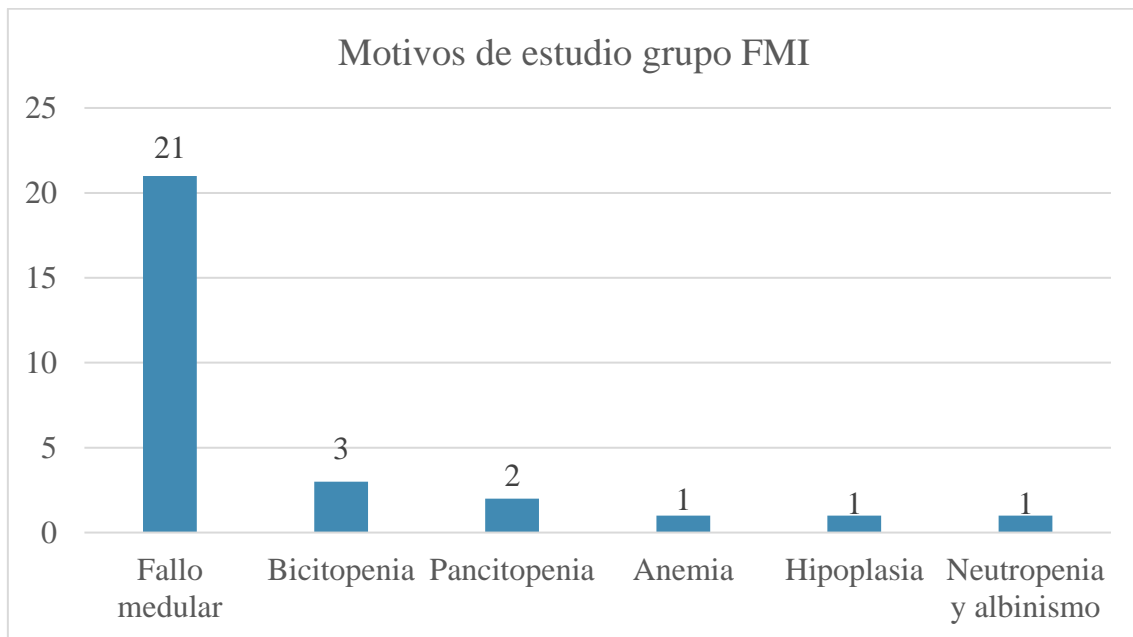


Gráfico 5.4: Distribución de pacientes dentro del grupo FMI

5.2 Análisis del rendimiento del panel NGS

En este apartado se analizan los parámetros de calidad, las características de las muestras rechazadas y la validación del panel con las características de los controles positivos.

5.2.1 Análisis de los parámetros de calidad

Se analizaron los datos de cobertura y profundidad de cada uno de los exones de los genes incluidos en el panel. Se consideraron como “exones con buena captura” aquellos con cobertura $\geq 20X$, considerándose como “exones mal capturados” aquellos que presentaron cobertura $< 20X$ en más del 1% del exón. Como genes con buena captura se consideraron todos aquellos en los que todos los exones fueron bien capturados. Los resultados globales se resumen en la tabla 5.1.

COBERTURA GLOBAL	LECTURAS	PORCENTAJE
Cobertura media	367	
Cobertura máxima	637	
Cobertura mínima	0	
Pares de bases analizadas	323902	
Pares de bases $\geq 20X$	310213	96%
Pares de bases $\geq 50X$	307921	95%
Exones	1867	
Exones con buena captura	1824	98%
Genes	128	
Genes con buena captura	117	91%

Tabla 5.1: Resultados globales de los parámetros de calidad

A continuación en la tabla 5.2, se detallan los datos de la cobertura y profundidad de cada uno de los genes secuenciados.

GEN	Refseq	#BP	#BP >= 20X	%BP >= 20X
ABCB7	NM_004299	2262	2262	100,00%
AK2	NM_001625	720	720	100,00%
ALAS2	NM_000032	1764	1764	100,00%
ANKRD26	NM_014915	5133	5133	100,00%
AP3B1	NM_003664	3285	3285	100,00%
ATM	NM_001351834	9171	9171	100,00%
ATR	NM_001184	7935	7935	100,00%
BACH1	NM_206866	2211	2211	100,00%
BLM	NM_001287246	4254	4254	100,00%
BLOC1S3	NM_212550	609	609	100,00%
BRCA1	NM_007300	5589	5589	100,00%
BRCA2	NM_000059	10257	10257	100,00%
CDAN1	NM_138477	3684	3684	100,00%
CENPJ	NM_018451	4017	4017	100,00%
CEP152	NM_001194998	5133	5133	100,00%
CEP63	NM_025180	2112	2112	100,00%
CLPB	NM_030813	2124	2124	100,00%
CSF3R	NM_156039	2592	2592	100,00%
CTC1	NM_025099	3654	3654	100,00%
CXCR2	NM_001557	1083	1083	100,00%
CXCR4	NM_001348056	1059	1059	100,00%
CYCS	NM_018947	318	318	100,00%
DDX41	NM_016222	1952	1952	100,00%
DKC1	NM_001363	1545	1545	100,00%
DNA2	NM_001080449	3183	3183	100,00%
DNM2	NM_001005361	2613	2613	100,00%
DTNBP1	NM_032122	1056	1056	100,00%
ELANE	NM_001972	804	804	100,00%
ERCC4	NM_005236	2751	2751	100,00%
ERCC6L2	NM_020207	2133	2133	100,00%
ESCO2	NM_001017420	1806	1806	100,00%
ETV6	NM_001987	1359	1359	100,00%
FANCA	NM_000135	4368	4368	100,00%
FANCB	NM_152633	2580	2580	100,00%
FANCC	NM_001243743	1677	1677	100,00%
FANCF	NM_022725	1125	1125	100,00%

FANCG	NM_004629	1869	1869	100,00%
FANCI	NM_001113378	3987	3987	100,00%
FANCL	NM_001114636	1143	1143	100,00%
FANCM	NM_020937	6147	6147	100,00%
G6PC3	NM_138387	1041	1041	100,00%
GATA1	NM_002049	1242	1242	100,00%
GATA2	NM_032638	1443	1443	100,00%
GFII	NM_005263	1269	1269	100,00%
GLRX5	NM_016417	474	474	100,00%
HAX1	NM_006118	992	992	100,00%
HOXA11	NM_005523	942	942	100,00%
HPS1	NM_001322477	2103	2103	100,00%
HPS3	NM_032383	3015	3015	100,00%
HPS4	NM_001349901	2181	2181	100,00%
HPS6	NM_024747	2328	2328	100,00%
ITGA2B	NM_000419	3353	3353	100,00%
JAGN1	NM_032492	552	552	100,00%
LAMTOR2	NM_014017	378	378	100,00%
LIG4	NM_001352604	2684	2684	100,00%
LYST	NM_001301365	11406	11406	100,00%
MASTL	NM_001320757	2640	2640	100,00%
MPL	NM_005373	1908	1908	100,00%
MRE11A	NM_005591	2127	2127	100,00%
MYH9	NM_002473	5883	5883	100,00%
MYO5A	NM_000259	5568	5568	100,00%
NBEAL2	NM_015175	8265	8265	100,00%
NBN	NM_002485	2265	2265	100,00%
NHEJ1	NM_024782	900	900	100,00%
NHP2	NM_017838	462	462	100,00%
NIN	NM_020921	6402	6402	100,00%
NOP10	NM_018648	195	195	100,00%
PALB2	NM_024675	3561	3561	100,00%
PUS1	NM_025215	1284	1284	100,00%
RAB27A	NM_183236	666	666	100,00%
RAD50	NM_005732	3939	3939	100,00%
RAD51	NM_133487	902	902	100,00%
RAD51C	NM_058216	1131	1131	100,00%
RBBP8	NM_203291	2694	2694	100,00%
RBM8A	NM_005105	525	525	100,00%
RPL11	NM_000975	537	537	100,00%

RPL19	NM_000981	591	591	100,00%
RPL26	NM_001315531	438	438	100,00%
RPL27	NM_001349922	411	411	100,00%
RPL31	NM_001098577	387	387	100,00%
RPL35A	NM_001316311	333	333	100,00%
RPL5	NM_000969	894	894	100,00%
RPS10	NM_001204091	498	498	100,00%
RPS19	NM_001321485	471	471	100,00%
RPS24	NM_001142285	870	870	100,00%
RPS28	NM_001031	459	459	100,00%
RPS29	NM_001030001	204	204	100,00%
RTEL1	NM_001283009	3987	3987	100,00%
RUNX1	NM_001754	1443	1443	100,00%
SEC23B	NM_032986	2304	2304	100,00%
SLC19A2	NM_006996	1494	1494	100,00%
SLC25A38	NM_017875	915	915	100,00%
SLX4	NM_032444	5505	5505	100,00%
SRP72	NM_006947	2016	2016	100,00%
STEAP3	NM_182915	1497	1497	100,00%
TAZ	NM_001303465	1008	1008	100,00%
TCIRG1	NM_006019	2493	2493	100,00%
TINF2	NM_001099274	1356	1356	100,00%
TRNT1	NM_182916	1305	1305	100,00%
TSR2	NM_058163	576	576	100,00%
TUBB1	NM_030773	1356	1356	100,00%
USB1	NM_024598	798	798	100,00%
VPS13B	NM_017890	12069	12069	100,00%
VPS45	NM_007259	1713	1713	100,00%
WAS	NM_000377	1509	1509	100,00%
WIPF1	NM_003387	1512	1512	100,00%
WRAP53	NM_018081	1647	1647	100,00%
CEBPA	NM_001287424	1182	1182	100,00%
RPS27	NM_001030	255	255	100,00%
RPS26	NM_001029	348	348	100,00%
RPS7	NM_001011	585	585	100,00%
RPL15	NM_002948	615	615	100,00%
PLDN	NM_019788	28877	28877	100,00%
TERC	NR_001566	541	541	100,00%
RECQL4	NM_004260	3693	3692	99,97%
SLC37A4	NM_001164278	1357	1356	99,93%

<i>ITGB3</i>	NM_000212	2367	2327	98,31%
<i>FANCE</i>	NM_021922	1611	1582	98,19%
<i>EIF2AK3</i>	NM_004836	3351	3284	98,00%
<i>ADAMTS13</i>	NM_139025	4284	4146	96,77%
<i>GPIBA</i>	NM_000173	1959	1886	96,27%
<i>WRN</i>	NM_000553	4299	4137	96,23%
<i>TERT</i>	NM_198253	3399	3233	95,00%
<i>SBDS</i>	NM_016038	753	706	93,70%
<i>FANCD2</i>	NM_033084	4416	4090	92,62%
<i>DDX11</i>	NM_152438	2913	688	23,62%
<i>RPS17</i>	NM_001021	408	0	0,00%

Tabla 5.2: Datos de la cobertura y profundidad de los genes secuenciados

Como se puede observar en la tabla 5.2, la mayoría de los genes tienen más del 99% de las pares de bases con una cobertura $\geq 20X$. Solo 11 de ellos se encuentran por debajo del 99%. *ITGB3*, *FANCE*, *GP1BA*, *EIF2AK3*, *ADAMTS13*, *WRN*, *TERT*, *SBDS*, *FANCD2*, *DDX11* y *RPS17*. De estos genes se analizan a continuación los parámetros de calidad de forma detallada.

ITGB3 (NM_000212)

En este gen el 98,31% de las pares de bases tienen una profundidad $>20X$. Tal y como se puede observar en la tabla, este dato es a expensas de una disminución de la cobertura en el exón 1, con cobertura $<20X$ en la mitad del exón. Sin embargo, en este caso todo el exón tiene coberturas $>10X$. El resto de los exones se encuentran cubiertos al 100%.

Exon	Exon length	Avg_Coverage	% Coverage < 5	% Coverage 5-10	% Coverage 10-15	% Coverage 15-20	% Coverage < 20
exon 1	79	20,81	0	0	3,8	46,84	50,63
exon 2	86	328,97	0	0	0	0	0
exon 3	196	453,7	0	0	0	0	0
exon 4	253	545,64	0	0	0	0	0
exon 5	163	552,61	0	0	0	0	0
exon 6	162	507,73	0	0	0	0	0
exon 7	96	447,39	0	0	0	0	0
exon 8	90	475,1	0	0	0	0	0
exon 9	135	516,72	0	0	0	0	0
exon 10	430	488,82	0	0	0	0	0
exon 11	223	430,72	0	0	0	0	0
exon 12	101	507,01	0	0	0	0	0
exon 13	120	467,85	0	0	0	0	0
exon 14	167	518,17	0	0	0	0	0
exon 15	66	465,54	0	0	0	0	0

FANCE (NM_021922)

En este gen el 98,19% de las pares de bases tienen una profundidad >20X. Tal y como se puede observar en la tabla, este dato es a expensas de una disminución de la cobertura en el exón 1. Sin embargo, la cobertura media de este exón es de 94,5 y sólo tiene un 12,5% de las bases con cobertura <20X. El resto de los exones se encuentran cubiertos al 100%.

Exon	Exon length	Avg_Coverage	% Coverage < 5	% Coverage 5-10	% Coverage 10-15	% Coverage 15-20	% Coverage < 20
exon 1	248	94,5	0	0	4,84	7,66	12,5
exon 2	607	444,87	0	0	0	0	0
exon 3	45	277,58	0	0	0	0	0
exon 4	69	538,88	0	0	0	0	0
exon 5	144	443,02	0	0	0	0	0
exon 6	124	517,21	0	0	0	0	0
exon 7	79	388,15	0	0	0	0	0
exon 8	67	329,94	0	0	0	0	0
exon 9	126	576,47	0	0	0	0	0
exon 10	102	422,83	0	0	0	0	0

GPIBA (NM_000173)

En este gen el 96,27% de las pares de bases tienen una profundidad >20X. Tal y como se puede observar en la tabla, dado que este gen sólo tiene un exón, este dato es a expensas de una disminución de la cobertura en el mismo. Sin embargo, tan sólo un 3,7% de las pares de bases del exón tienen coberturas <20X, lo que se traduce en que más del 90% presenta buenos datos de cobertura.

Exon	Exon length	Avg_Coverage	% Coverage < 5	% Coverage 5-10	% Coverage 10-15	% Coverage 15-20	% Coverage < 20
exon 2	1959	489,69	0,87	0,87	1,28	0,31	3,73

EIF2AK3 (NM_004836)

En este gen el 98% de las pares de bases tienen una profundidad >20X. Tal y como se puede observar en la tabla, este dato es a expensas de una disminución de la cobertura en el exón 2 que presenta un 22% de las lecturas con datos de cobertura inferiores a 20X. El resto de los exones se encuentran cubiertos al 100%.

Exon	Exon length	Avg_Coverage	% Coverage < 5	% Coverage 5-10	% Coverage 10-15	% Coverage 15-20	% Coverage < 20
exon 2	308	129,33	0	13,31	2,92	6,49	22,73
exon 3	130	363,27	0	0	0	0	0
exon 4	195	493,88	0	0	0	0	0
exon 5	134	479,3	0	0	0	0	0
exon 6	235	441,86	0	0	0	0	0
exon 7	163	335,21	0	0	0	0	0
exon 8	141	392,21	0	0	0	0	0
exon 9	123	279,51	0	0	0	0	0
exon 10	221	437,57	0	0	0	0	0
exon 11	113	299,1	0	0	0	0	0
exon 12	123	384,55	0	0	0	0	0
exon 13	150	516,95	0	0	0	0	0
exon 14	781	528,38	0	0	0	0	0
exon 15	168	545,96	0	0	0	0	0
exon 16	102	299,95	0	0	0	0	0
exon 17	63	229,66	0	0	0	0	0
exon 18	201	482,41	0	0	0	0	0

ADAMTS13 (NM_139025)

En este gen el 96,77% de las pares de bases tienen una profundidad >20X. Tal y como se puede observar en la tabla, este dato es a expensas de una disminución de la cobertura en el exón 7 que presenta un 100% de las lecturas con datos de cobertura inferiores a 20X. El resto de los exones se encuentran cubiertos al 100%.

Exon	Exon length	Avg_Coverage	% Coverage < 5	% Coverage 5-10	% Coverage 10-15	% Coverage 15-20	% Coverage < 20
exon 1	105	306,83	0	0	0	0	0
exon 2	67	405,84	0	0	0	0	0
exon 3	158	357,17	0	0	0	0	0
exon 4	84	336,16	0	0	0	0	0
exon 5	125	479,31	0	0	0	0	0
exon 6	147	426,23	0	0	0	0	0
exon 7	138	10,92	0	35,51	64,49	0	100
exon 8	163	350,09	0	0	0	0	0
exon 9	105	380,07	0	0	0	0	0
exon 10	152	355,14	0	0	0	0	0
exon 11	64	249,88	0	0	0	0	0
exon 12	127	127,44	0	0	0	0	0
exon 13	149	341,99	0	0	0	0	0
exon 14	121	400,78	0	0	0	0	0
exon 15	81	471,43	0	0	0	0	0
exon 16	182	373,11	0	0	0	0	0
exon 17	136	433,97	0	0	0	0	0
exon 18	130	325,68	0	0	0	0	0
exon 19	186	112,47	0	0	0	0	0
exon 20	190	351,6	0	0	0	0	0
exon 21	121	349,22	0	0	0	0	0
exon 22	130	316,84	0	0	0	0	0
exon 23	183	311,16	0	0	0	0	0
exon 24	205	323,38	0	0	0	0	0
exon 25	319	293,8	0	0	0	0	0
exon 26	147	407,99	0	0	0	0	0
exon 27	177	403,43	0	0	0	0	0
exon 28	185	425,31	0	0	0	0	0
exon 29	207	453,18	0	0	0	0	0

WRN (NM_000553)

El 96,23% de las pares de bases tienen una profundidad >20X. Este dato es a expensas de una disminución de la cobertura en los exones 10 y 11, con el 100% de las bases con coberturas inferiores a 5X. El resto de exones están cubiertos al 100%.

Exon	Exon length	Avg_Coverage	% Coverage < 5	% Coverage 5-10	% Coverage 10-15	% Coverage 15-20	% Coverage < 20
exon 2	96	304,85	0	0	0	0	0
exon 3	113	281,86	0	0	0	0	0
exon 4	146	391,5	0	0	0	0	0
exon 5	149	307,86	0	0	0	0	0
exon 6	150	341,82	0	0	0	0	0
exon 7	70	269,26	0	0	0	0	0
exon 8	115	381,54	0	0	0	0	0
exon 9	430	337,41	0	0	0	0	0
exon 10	81	0,5	100	0	0	0	100
exon 11	81	3,17	100	0	0	0	100
exon 12	145	358,41	0	0	0	0	0
exon 13	76	295,29	0	0	0	0	0
exon 14	68	266,65	0	0	0	0	0
exon 15	109	346,51	0	0	0	0	0
exon 16	69	314,69	0	0	0	0	0
exon 17	83	240,89	0	0	0	0	0
exon 18	107	400,32	0	0	0	0	0
exon 19	185	421,55	0	0	0	0	0
exon 20	175	388,86	0	0	0	0	0
exon 21	182	433,67	0	0	0	0	0
exon 22	102	246,35	0	0	0	0	0
exon 23	93	261,53	0	0	0	0	0
exon 24	142	362,04	0	0	0	0	0
exon 25	171	514,67	0	0	0	0	0
exon 26	95	422,35	0	0	0	0	0
exon 27	76	242,23	0	0	0	0	0
exon 28	74	203,5	0	0	0	0	0
exon 29	76	297,76	0	0	0	0	0
exon 30	113	421,04	0	0	0	0	0
exon 31	115	414,81	0	0	0	0	0
exon 32	132	288,4	0	0	0	0	0
exon 33	163	473,5	0	0	0	0	0
exon 34	209	435,95	0	0	0	0	0

TERT (NM_198253)

En este gen el 95% de las pares de bases tienen una profundidad >20X. Tal y como se puede observar en la tabla, este dato es a expensas de una disminución de la cobertura en el exón 2, con casi un 75% de las bases del exón <20X. El resto de los exones se encuentran cubiertos al 100%.

Exon	Exon length	Avg_Coverage	% Coverage < 5	% Coverage 5-10	% Coverage 10-15	% Coverage 15-20	% Coverage < 20
exon 2	219	23,47	18,72	32,88	9,59	13,24	74,43
exon 3	1354	293,01	0	0	0	0	0
exon 4	196	437,73	0	0	0	0	0
exon 5	181	460,39	0	0	0	0	0
exon 6	180	226,55	0	0	0	0	0
exon 7	156	419,45	0	0	0	0	0
exon 8	96	252,16	0	0	0	0	0
exon 9	86	114,3	0	0	0	0	0
exon 10	114	370,57	0	0	0	0	0
exon 11	72	538,85	0	0	0	0	0
exon 12	189	440,02	0	0	0	0	0
exon 13	127	398,35	0	0	0	0	0
exon 14	62	263,6	0	0	0	0	0
exon 15	125	494,82	0	0	0	0	0
exon 16	138	277,48	0	0	0	0	0
exon 17	104	227,35	0	0	0	0	0

SBDS (NM_016038)

SBDS presenta un 93,7% de las pares de bases con una profundidad >20X. Tal y como se puede observar en la tabla, este dato es a expensas de una disminución de la cobertura en el exón 5. El resto de los exones se encuentran cubiertos al 100%.

Exon	Exon length	Avg_Coverage	% Coverage < 5	% Coverage 5-10	% Coverage 10-15	% Coverage 15-20	% Coverage < 20
exon 2	128	88,26	0	0	0	0	0
exon 3	130	74,6	0	0	0	0	0
exon 4	201	270,22	0	0	0	0	0
exon 5	165	58,16	7,88	4,85	12,12	4,85	29,7
exon 6	129	276,37	0	0	0	0	0

FANCD2 (NM_033084)

Este gen presenta un 92,62% de las pares de bases con una profundidad >20X. Tal y como se puede observar en la tabla, este dato es a expensas de una disminución de la cobertura en los exones 17, 21 y 22 que presentan coberturas <20X en el 100% de los mismos. El resto de los exones se encuentran cubiertos al 100%.

Exon	Exon length	Avg_Coverage	% Coverage < 5	% Coverage 5-10	% Coverage 10-15	% Coverage 15-20	% Coverage < 20
exon 2	64	358,22	0	0	0	0	0
exon 3	141	319,72	0	0	0	0	0
exon 4	68	333,95	0	0	0	0	0
exon 5	104	483,54	0	0	0	0	0
exon 6	61	222,35	0	0	0	0	0
exon 7	53	380,65	0	0	0	0	0
exon 8	79	354,7	0	0	0	0	0
exon 9	125	494,31	0	0	0	0	0
exon 10	88	356,03	0	0	0	0	0
exon 11	105	349,69	0	0	0	0	0
exon 12	101	365,36	0	0	0	0	0
exon 13	109	161,47	0	0	0	0	0
exon 14	36	95,61	0	0	0	0	0
exon 15	144	199,52	0	0	0	0	0
exon 16	135	232,3	0	0	0	0	0
exon 17	132	15,17	0	3,79	67,42	28,79	100
exon 18	111	241,39	0	0	0	0	0
exon 19	110	377,29	0	0	0	0	0
exon 20	61	329,67	0	0	0	0	0
exon 21	120	4,5	46,67	53,33	0	0	100
exon 22	74	6,2	60,81	35,14	4,05	0	100
exon 23	147	181,23	0	0	0	0	0
exon 24	101	316,68	0	0	0	0	0
exon 25	116	123,15	0	0	0	0	0
exon 26	109	327,35	0	0	0	0	0
exon 27	111	265,02	0	0	0	0	0
exon 28	110	173,27	0	0	0	0	0
exon 29	144	355,76	0	0	0	0	0
exon 30	117	493,62	0	0	0	0	0
exon 31	129	433,27	0	0	0	0	0
exon 32	119	371,72	0	0	0	0	0
exon 33	111	437,44	0	0	0	0	0
exon 34	131	354,69	0	0	0	0	0

exon 35	94	460,72	0	0	0	0	0
exon 36	123	493,03	0	0	0	0	0
exon 37	94	488,01	0	0	0	0	0
exon 38	72	464,38	0	0	0	0	0
exon 39	39	503,23	0	0	0	0	0
exon 40	75	382,58	0	0	0	0	0
exon 41	75	402,03	0	0	0	0	0
exon 42	147	485,91	0	0	0	0	0
exon 43	231	489,93	0	0	0	0	0

DDX11 (NM_152438)

En este gen, tan sólo el 23,62% de las pares de bases tienen una profundidad >20X. Como se muestra en la tabla siguiente, prácticamente la mitad de los exones presentan cobertura inferior a 20X. Tan sólo los exones 2, 5, 10, 21 y 26 presentan más del 50% de las lecturas con una cobertura mayor a 20X.

Exon	Exon length	Avg_Coverage	% Coverage < 5	% Coverage 5-10	% Coverage 10-15	% Coverage 15-20	% Coverage < 20
exon 2	144	53,07	0	9,03	24,31	4,17	37,5
exon 3	249	23,95	55,82	6,43	4,02	1,61	67,87
exon 4	87	13,6	0	19,54	50,57	29,89	100
exon 5	158	34,4	0	21,52	4,43	10,76	36,71
exon 6	46	49,7	0	0	0	0	0
exon 7	108	33,71	0	0	0	0	0
exon 8	88	116,59	0	0	0	0	0
exon 9	209	11,76	61,24	14,83	11,48	9,09	96,65
exon 10	153	39,02	7,19	3,27	5,88	6,54	22,88
exon 11	47	106,03	0	0	0	0	0
exon 12	80	76,54	0	0	0	0	0
exon 13	45	13,36	0	60	6,67	33,33	100
exon 14	68	38,23	0	0	0	0	0
exon 15	39	18,07	0	17,95	28,21	12,82	58,97
exon 16	109	14,94	0	0	67,89	32,11	100
exon 17	132	88,85	0	0	0	0	0
exon 18	113	89,38	0	0	0	0	0
exon 19	73	8,89	0	75,34	24,66	0	100
exon 20	104	106,62	0	0	0	0	0
exon 21	150	39,95	0	0	0	18,67	18,67
exon 22	69	74,05	0	0	0	0	0
exon 23	101	50,81	0	0	0	0	0
exon 24	85	93,98	0	0	0	0	0
exon 25	74	3	100	0	0	0	100
exon 26	155	34,75	0	0	7,1	12,9	20
exon 27	227	80,43	0	0	0	0	0

***RPS17* (NM_001021)**

El caso de *RPS17* es el más problemático, ya que el 100% del gen presenta coberturas de 0, no hay datos de profundidad en ninguno de los 5 exones secuenciados.

Exon	Exon length	Avg_Coverage	% Coverage < 5	% Coverage 5-10	% Coverage 10-15	% Coverage 15-20	% Coverage < 20
exon 2	3	0	100	0	0	0	100
exon 3	152	0	100	0	0	0	100
exon 4	106	0	100	0	0	0	100
exon 5	66	0	100	0	0	0	100
exon 6	81	0	100	0	0	0	100

De todos los genes comentados, tan solo *DDX11* y *RPS17* no cumplen con los criterios de calidad establecidos, ya que presentan coberturas globales inferiores al 80%.

5.2.2 Muestras rechazadas

De las 130 muestras secuenciadas, 5 (4%) fueron rechazadas para el análisis debido a que los parámetros de cobertura y profundidad de las mismas no superaron el control de calidad establecido. En la tabla 5.2 se muestran los datos de calidad de las muestras rechazadas.

	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4		Muestra 5	
	Lecturas	%	Lecturas	%	Lecturas	%	Lecturas	%	Lecturas	%
Cobertura media	3		5		24		6		12	
Cobertura máxima	169		267		495		259		144	
Cobertura mínima	0		0		0		0		0	
PB analizados	323902		323902		323902		323902		323902	
PB >= 20X	15807	5%	15846	5%	156099	48%	16340	5%	46149	14%
PB >= 50X	12428	4%	15780	5%	16276	5%	15646	5%	10605	3%
Exones	1867		1867		1867		1867		1867	
Exones capturados	47	3%	48	3%	275	15%	48	3%	64	3%
Genes	164		164		164		164		164	
Genes capturados	1	1%	2	1%	3	2%	2	1%	0	0

Tabla 5.2: Datos de calidad de muestras rechazadas

5.2.3 Validación del panel

Se ha realizado secuenciación Sanger de las 61 mutaciones detectadas, confirmándose en la totalidad de las mismas.

En el análisis se incluyeron como control positivo un total de 10 (8%) pacientes ya diagnosticados previamente mediante técnicas convencionales. En el 100% de los controles positivos se detectó la mutación causal.

La mitad de los controles (50%) se correspondían con pacientes diagnosticados de Anemia de Blackfan-Diamond, siendo el gen más frecuentemente mutado *RPS19*. Le seguían en frecuencia los pacientes afectados de Anemia de Fanconi (30%), Síndrome de Shwachman-Diamond (10%) y Macrotrombopenia asociada a *MYH9* (10%). Se describen las características de cada uno en la tabla 5.3.

DIAGNÓSTICO	ID	GEN	HERENCIA	MUTACIÓN	TIPO
Anemia Blackfan-Diamond	02004	<i>RPS19</i>	HT	c.385_386del (p.R129fs)	<i>frameshift deletion</i>
	11004	<i>RPS19</i>	HT	c.1A>G (p.M1V)	<i>missense</i>
	11006	<i>RPS19</i>	HT	c.280C>T (p.R94X)	<i>missense</i>
	02005	<i>RPL35A</i>	HT	c.78_80del (p.26_27del)	<i>nonframeshift deletion</i>
	09001	<i>RPS26</i>	HT	c.151_152del (p.R51fs)	<i>frameshift deletion</i>
Anemia de Fanconi	01003	<i>FANCG</i>	HM	c.1642C>T (p.R548X)	<i>stop_gained</i>
	02012	<i>FANCA</i>	HM	c.1115_1118del (p.V372fs)	<i>frameshift deletion</i>
	02016	<i>FANCA</i>	HM	c.295C>T (p.Q99X)	<i>stop_gained</i>
Síndrome Shwachman-Diamond	01001	<i>SBDS</i>	HEM	c.183_184delTAinsCT (p.Lys62Ter)	<i>frameshift deletion</i>
				c.258+2T>C	<i>splicing</i>
Macrotrombopenia asociada a MYH9	02018	<i>MYH9</i>	HT	c.220A>G (p.K74E)	<i>missense</i>

Tabla 5.3: Mutaciones detectadas en controles positivos

5.3 Análisis de la capacidad diagnóstica del panel NGS.

5.3.1 Resultados de la serie

Una vez rechazadas 5 muestras por no cumplir los criterios de calidad establecidos, se analizaron 125, entre las que se encuentran incluidas los controles positivos. Finalmente, fueron analizadas 115 muestras de pacientes sin diagnóstico molecular. Se detectaron 60 mutaciones compatibles con la sospecha diagnóstica en 51 pacientes, alcanzando una tasa de rendimiento diagnóstico del 44%. Del total de los pacientes diagnosticados, la gran mayoría habían sido incluidos dentro del grupo denominado FMD, correspondiendo al 84% (43) del grupo. Los 8 restantes se encontraban en el grupo denominado como FMI.

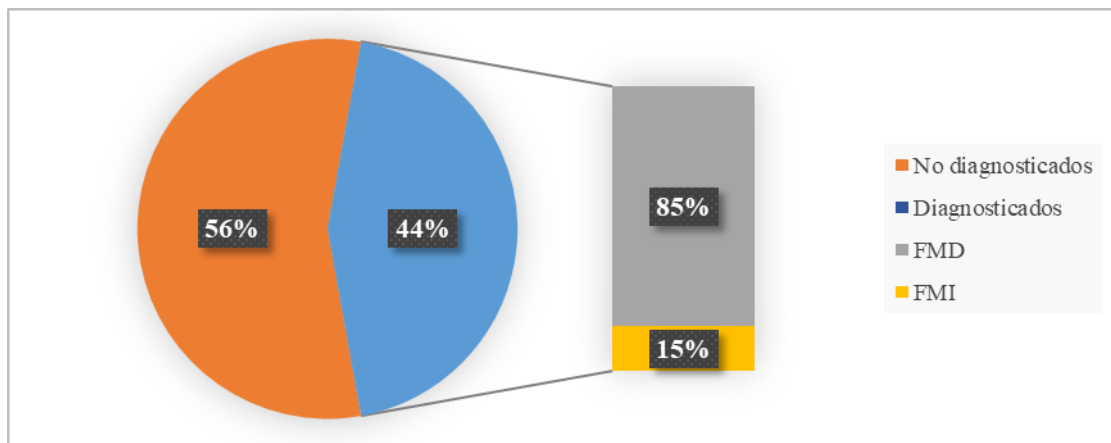


Gráfico 5.5: Distribución de los grupos en pacientes diagnosticados

De las 60 mutaciones detectadas, 31 fueron de tipo *missense*, 14 *indels*, 8 en regiones de *splicing* y 7 *nonsense*. De las 60 mutaciones detectadas, 20 eran mutaciones no descritas y candidatas a ser patogénicas según los criterios establecidos previamente. De ellas, 6 se clasificaron como probablemente patogénicas, 3 patogénicas y 11 de significado incierto.

En los 51 pacientes se detectaron mutaciones en 24 genes diferentes, siendo *FANCA* el gen más frecuentemente mutado de la serie. En la tabla 5.4 se detallan los genes afectados por orden de frecuencia.

GEN	Nº	%	OMIM
<i>FANCA</i>	9	18%	607139
<i>MYH9</i>	4	8%	160775
<i>TERT</i>	4	8%	187270
<i>RPS26</i>	3	6%	603701
<i>DKC1</i>	3	6%	300126
<i>RTEL1</i>	3	6%	608833
<i>RPS19</i>	2	4%	603474
<i>FANCG</i>	2	4%	602956
<i>GP1BA</i>	2	4%	606672
<i>MPL</i>	2	4%	159530
<i>RPL11</i>	2	4%	604175
<i>RPL5</i>	2	4%	603634
<i>RPS7</i>	2	4%	603658
<i>SBDS</i>	1	2%	607444
<i>AP3B1</i>	1	2%	603401
<i>BLM</i>	1	2%	604610
<i>ELANE</i>	1	2%	130130
<i>ITGA2B</i>	1	2%	607759
<i>JAGN1</i>	1	2%	616012
<i>RBM8A</i>	1	2%	605313
<i>RECQL4</i>	1	2%	603780
<i>RPS24</i>	1	2%	602412
<i>RPS29</i>	1	2%	603633
<i>TCIRG1</i>	1	2%	604592

Tabla 5.4: Frecuencia de genes detectados en este trabajo.

5.3.2 Resultados del grupo FMD

Del total de pacientes sin diagnóstico molecular previo aptos para el análisis (115), 86 se incluyeron en el grupo denominado FMD (75%). En este grupo se detectaron un total de 53 mutaciones en 44 pacientes (10 de ellos fueron homocigotos para la mutación), alcanzándose un rendimiento diagnóstico del 51% en este grupo.

De los 86 pacientes incluidos en este grupo, 19 fueron estudiados por sospecha de eritroblastopenia congénita, 17 por sospecha de AF, 17 por sospecha de TC, 11 por NCG, 12 por DC, 6 por SSD, 2 por TAC, 1 SMD familiar y 1 ADC.

Como hemos comentado previamente, el diagnóstico molecular se confirmó en 44 de los 86 pacientes. Los diagnósticos finales fueron ABD (13), AF (11), TC (9), DC (8), NCG (3) SSD (1). A continuación, se muestra en el gráfico 5.6 la distribución de los pacientes estudiados y diagnosticados dentro del grupo FMD.

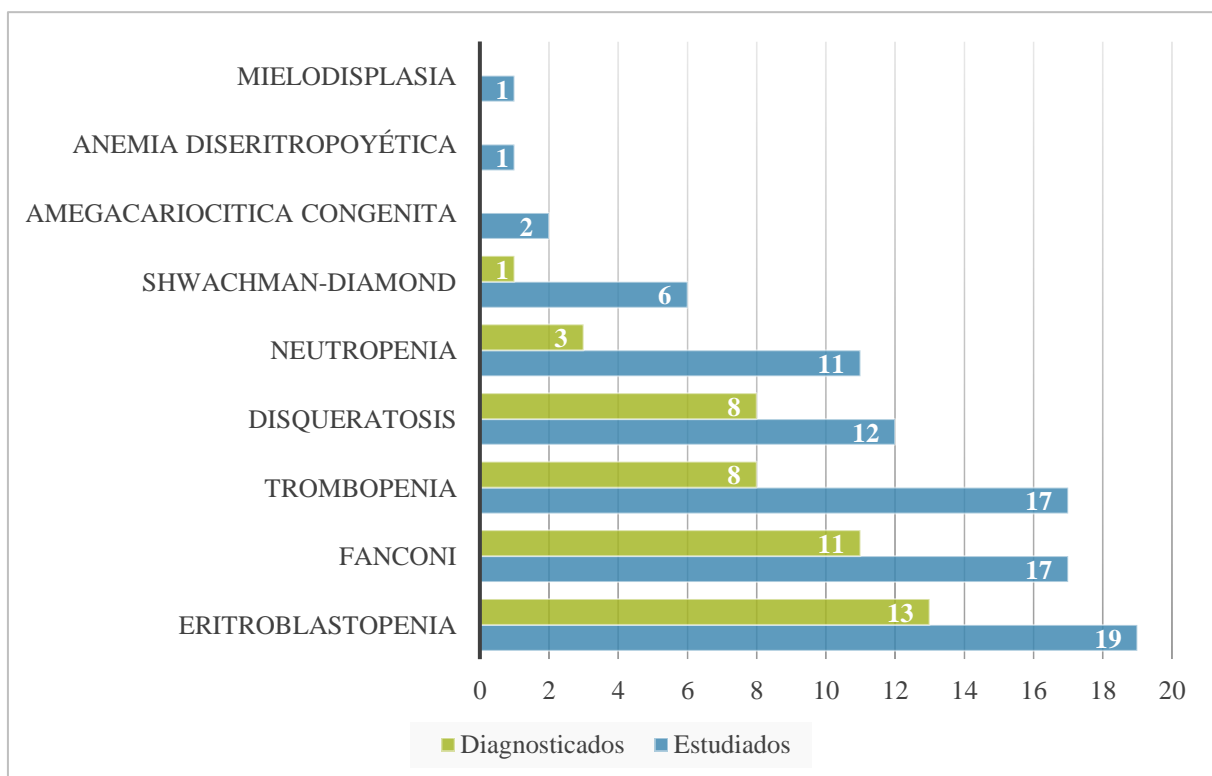


Gráfico 5.6: Distribución pacientes estudiados y diagnosticados

5.3.2.1 Resultados por patologías dentro del grupo FMD

5.3.2.1.1 Eritroblastopenia

De los 19 pacientes remitidos por sospecha de eritroblastopenia congénita se diagnosticaron 12, alcanzando una tasa diagnóstica en este subgrupo del 63%. El diagnóstico molecular de todos ellos fue ABD. Todas las mutaciones detectadas se encontraron en heterocigosis, de acuerdo al patrón de herencia autosómica dominante descrito en esta patología. El gen más frecuentemente mutado fue *RPS26*, detectándose en 3 de los 12 casos. Le siguen en frecuencia *RPL11*, *RPL5* y *RPS7* mutados en 2 pacientes cada uno y *RPL35A*, *RPS24*, *RPS19* y *RPS29*, que se hallaron mutados en tan sólo un paciente. La proporción se muestra en el gráfico 5.7.

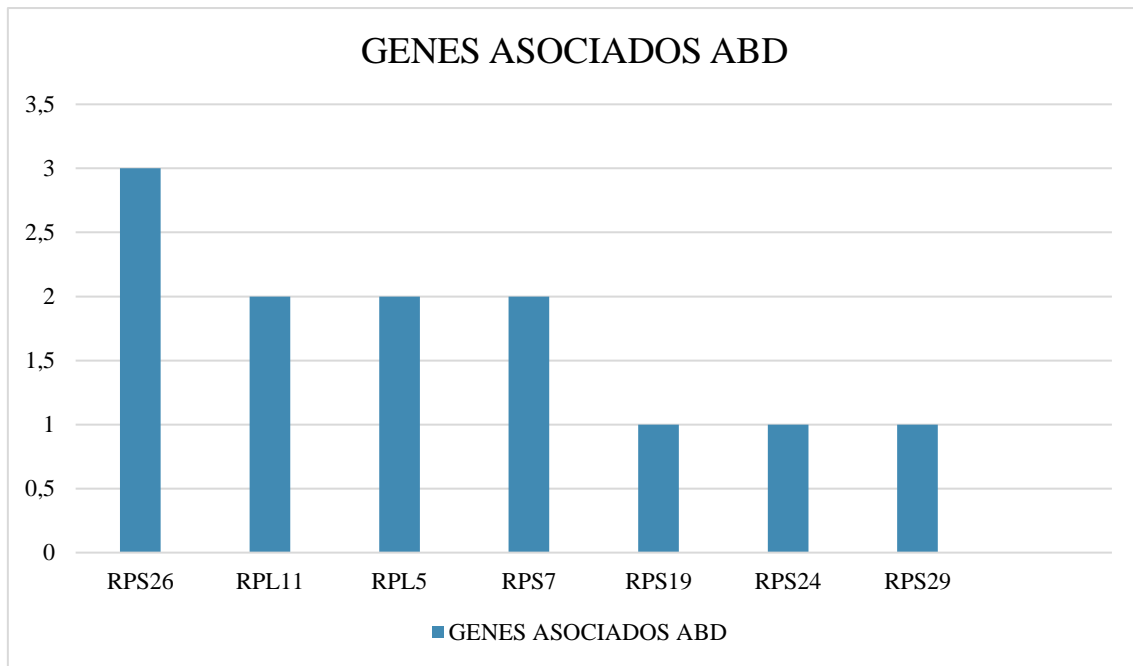


Gráfico 5.7: Frecuencia de genes asociados a ABD

En cuanto a las mutaciones detectadas, el 50% (6) habían sido descritas en la literatura y bases de datos consultadas. Las características de cada mutación se relacionan en la tabla 5.5.

GEN	HERENCIA	MUTACIÓN	TIPO	DIAGNÓSTICO FINAL	REFERENCIA	CLASIF. ACMG MUTACIÓN NO DESCRITA
<i>RPL11</i>	HT	c.60_61delCT (p.C21Serfs)	<i>indel</i>	DBA7 (612562)	Gazda et al. 2008 ¹⁵³	
<i>RPL11</i>	HT	c.158-2A>C	<i>splicing</i>	DBA7 (612562)	DBA database ¹⁵⁴	
<i>RPL5</i>	HT	c.582_592del (p.V194fs)	<i>indel</i>	DBA6 (612561)	No descrita	Probablemente patogénica
<i>RPL5</i>	HT	c.3+5 G>A	<i>splicing</i>	DBA6 (612561)	No descrita	Significado incierto
<i>RPS19</i>	HT	c.280C>T (p.R94X)	<i>nonsense</i>	DBA1 (105650)	Willig et al. 1999 ¹⁵⁵ Cmejla et al. 2000 ¹⁵⁶	
<i>RPS24</i>	HT	c.228_229ins A (p.Y76f)	<i>indel</i>	DBA3 (610629)	No descrita	Probablemente patogénica
<i>RPS26</i>	HT	c.259C>T (p.R87X)	<i>nonsense</i>	DBA10 (613309)	Gripp et al. 2014 ⁹⁵	
<i>RPS26</i>	HT	c.A1G (p.M1V)	<i>missense</i>	DBA10 (613309)	Doherty et al. 2010 ¹⁵⁷	
<i>RPS26</i>	HT	c.344T>C (p.M115T)	<i>missense</i>	DBA10 (613309)	Doherty et al. 2010 ¹⁵⁷	
<i>RPS29</i>	HT	c.162+3A>C	<i>splicing</i>	DBA13 (615909)	No descrita	Significado incierto
<i>RPS7</i>	HT	c.75+2T>G	<i>splicing</i>	DBA8 (612563)	No descrita	Patogénica
<i>RPS7</i>	HT	c.79C>A (p.L27I)	<i>missense</i>	DBA8 (612563)	No descrita	Significado incierto

Tabla 5.5: Descripción de las mutaciones detectadas en el grupo de pacientes estudiados por Eritroblastopenia. HT: heterocigosis

5.3.2.1.2 Anemia de Fanconi (AF)

De los 17 pacientes remitidos por sospecha de Anemia de Fanconi se diagnosticaron 11, siendo el rendimiento diagnóstico en este subgrupo del 65%. El 80% de los pacientes en los que se detectó mutación fueron diagnosticados de Anemia de Fanconi tipo A, siendo el gen más frecuentemente mutado fue *FANCA*. *FANCG* fue el gen afecto en el 20% restante. Se detectaron 17 mutaciones en 11 pacientes ya que dado el carácter recesivo de esta patología, las mutaciones se detectaron en homocigosis en 9 pacientes y doble heterocigosis en 5 de ellos. De las 17 mutaciones detectadas, el 88% (15) habían sido descritas en la literatura y bases de datos consultadas. El tipo de mutación se distribuyó tal y como se describe en la tabla 5.6.

GEN	HERENCIA	MUTACION	TIPO	REFERENCIA	CLASIFICACION ACMG MUTACIÓN NO DESCRITA
FANCA	HM	c.1303C>T (p.R435C)	missense	Tachibana et al. 1999 ¹⁵⁸	
	HM	c.3558dupG (p.R1187fs)	indel	Savino et al. 1997 ¹⁵⁹	
	HM	c.295C>T (p.Q99X)	nonsense	Callén et al. 2005 ¹⁶⁰	
	DHT	Mutación 1: c.2398G>T (p.E800X)	nonsense	Mutación 1: No descrita	Patogénica
		Mutación 2: c.2151G>T (p.M717I)	missense	Mutación 2: FA mutation database ¹⁶¹	
	DHT	Mutación 1: c.2851C>G (p.R951G)	missense	Mutación 1: Chandra et al. 2005 ¹⁶²	
		Mutación 2: c.3788_3790del (p.1263_1264del)	deletion	Mutación 2: Wijker et al. 1999 ¹⁶³	
	HM	c.3558dupG (p.R1187fs)	indel	Savino et al. 1997 ¹⁵⁹	
	HM	c.3763G>T (p.E1255X)	nonsense	No descrita	Patogénica
	DHT	Mutación 1: c.3913C>T (p.L1305F)	missense	Mutación 1: FA mutation database ¹⁶¹	
		Mutación 2: c.3788_3790del (p.1263_1264del)	deletion	Mutación 2: Wijker et al. 1999 ¹⁶³	
	HM	c.295C>T (p.Q99X)	nonsense	Callén et al. 2005 ¹⁶⁰	
	DHT	Mutación 1: c.4130C>G (p.S1377X)	missense	Mutación 1: Ameziane et al. 2008 ¹⁶⁴	
		Mutación 2: c.1115_1118del (p.V372fs)	deletion	Mutación 2: Ameziane et al. 2008 ¹⁶⁴	
FANCG	HM	c.1077-2A>G	splicing	Auerbach et al 2003 ¹⁶⁵	
	DHT	Mutación 1: c.1642C>T (p.R548X)	nonsense	Mutación 1: Auerbach et al 2003 ¹⁶⁵	
		Mutación 2: c.908T>C (p.L303P)	missense	Mutación 2: Auerbach et al 2003 ¹⁶⁵	

Tabla 5.6: Descripción de las mutaciones detectadas en el grupo de pacientes estudiados por Anemia de Fanconi. HM: homocigosis. DHT: doble heterocigosis

Todos los pacientes con mutaciones detectadas (11), tenían test de fragilidad cromosómica positivo. De los 7 restantes, en 5 de ellos no se había realizado el estudio y en 1 fue dudoso. Solo hubo un caso con test de fragilidad cromosómica positivo en el que no se detectó mutación puntual. Ante la alta sospecha de AF, se analizó el estudio de CNVs realizado por NGS. Mediante este análisis se detectó una pérdida significativa de pares de bases desde el exón 9 al 42 del gen *FANCA*. Dado que podía tratarse de una deleción de gran tamaño, se realizó el estudio por MLPA a la paciente y progenitores. Tal y como se puede en las imágenes siguientes, se confirmó en el paciente una deleción en el gen *FANCA* desde el exón 9 al 42, siendo la madre portadora de una deleción desde el exón 9 al 15 y su padre del 16 al 42.

1. ESTUDIO CNVs

En la imagen 5.1 se puede observar una disminución del *coverage* desde el exón 9 en el paciente (área roja) respecto a los pacientes control. En la imagen 5.2 se detallan el número de pérdidas por número de bases en función del exón.

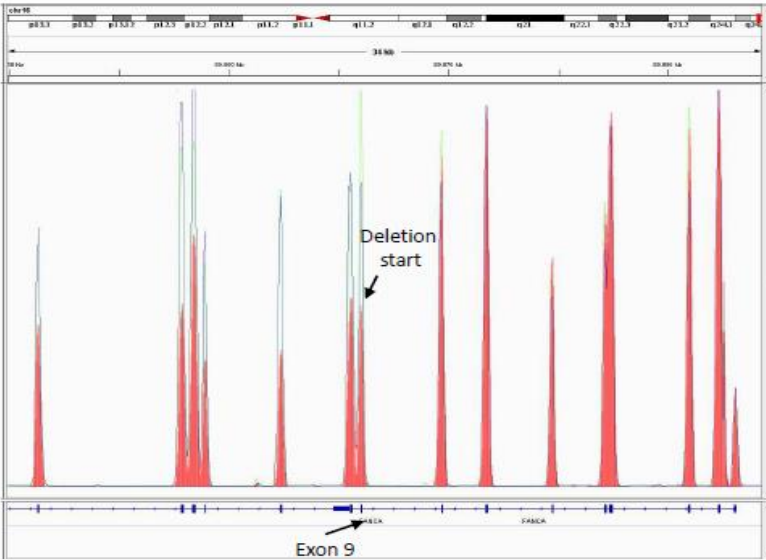


Imagen 5.1: Imagen IGV gen FANCA

Gene	Exon	numBase	gain_loss
FANCA	42	112	loss
FANCA	41	176	loss
FANCA	40	99	loss
FANCA	39	229	loss
FANCA	38	99	loss
FANCA	37	158	loss
FANCA	36	132	loss
FANCA	35	124	loss
FANCA	34	99	loss
FANCA	33	128	loss
FANCA	32	192	loss
FANCA	31	104	loss
FANCA	30	148	loss
FANCA	29	99	loss
FANCA	28	196	loss
FANCA	27	116	loss
FANCA	26	207	loss
FANCA	25	113	loss
FANCA	24	99	loss
FANCA	23	156	loss
FANCA	22	133	loss
FANCA	21	99	loss
FANCA	20	99	loss
FANCA	19	99	loss
FANCA	18	108	loss
FANCA	17	99	loss
FANCA	16	115	loss
FANCA	15	130	loss
FANCA	14	153	loss
FANCA	13	161	loss
FANCA	12	99	loss
FANCA	11	132	loss
FANCA	10	99	loss
FANCA	9	99	loss

Imagen 5.2: Análisis CNV

1. ESTUDIO MLPA GEN FANCA

Una vez sospechada la delección de gen, se procedió al estudio mediante MLPA de la paciente y progenitores. Las imágenes mostradas muestran la delección del exón 9 al 15 (imagen 5.3) correspondiente al padre, la delección de los exones 16 al 42 correspondiente a la madre (imagen 5.4) y la delección de los exones 9 al 42 correspondiente al paciente estudiado (imagen 5.5).

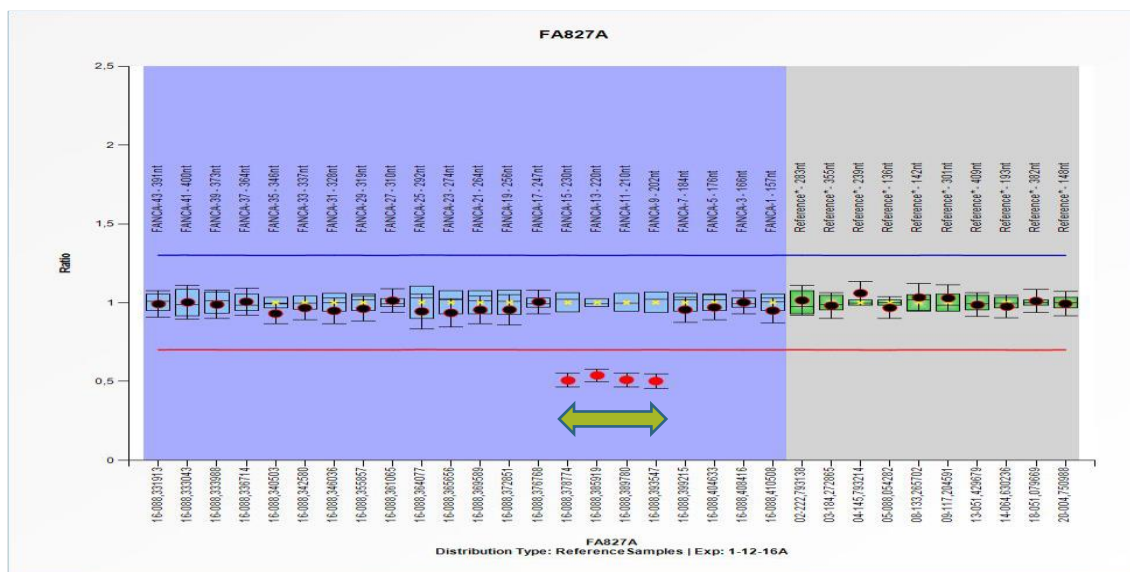


Imagen 5.3: Estudio paterno MPLA gen *FANCA*

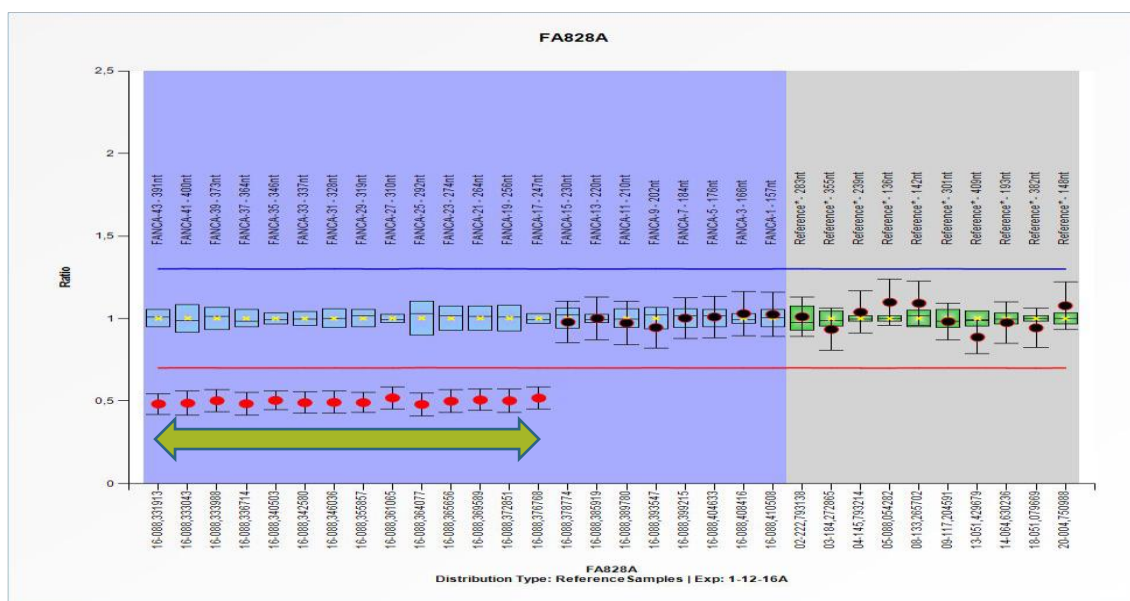


Imagen 5.4: Estudio materno MPLA gen *FANCA*

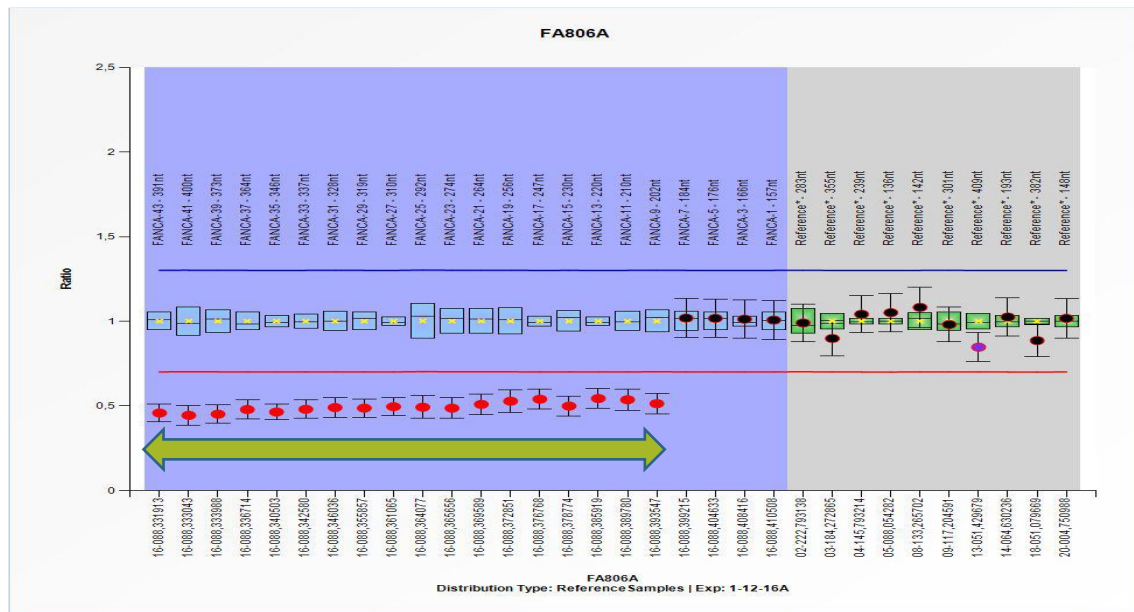


Imagen 5.5: Estudio paciente MPLA gen *FANCA*

5.3.2.1.3 Disqueratosis congénita (DC)

De los 12 pacientes estudiados por sospecha de DC, finalmente se diagnosticaron 8, alcanzando una tasa diagnóstica en este subgrupo del 66%. El diagnóstico molecular de todos ellos fue DC. Se detectaron 8 mutaciones en los 8 pacientes diagnosticados molecularmente, detectándose la mitad de ellas en homocigosis y la otra mitad en heterocigosis. En el caso de la DC, el patrón de herencia es diferente en función del gen afecto, habiéndose descrito casos de herencia dominante y recesiva en el mismo gen. En la tabla 5.7 se detallan los patrones de herencia descritos de los genes incluidos en el panel asociados a DC.

GEN	HERENCIA	LOCALIZACIÓN
<i>DKC1</i>	XLR	Xq28
<i>TERC</i>	AD	3q26.3
<i>TERT</i>	AD, AR	5p15.53
<i>TINF2</i>	AD	14q11.2
<i>NOPI0/NOLA3</i>	AR	15q14
<i>NHP2/NOLA2</i>	AR	5q35.5
<i>TCAB1/WRAP53</i>	AR	17p13
<i>RTEL1</i>	AD, AR	20q13.3
<i>CTCI</i>	AD	17p13.1
<i>NHEJ1/XLF</i>	AR	2q35
<i>ACD</i>	AR, AD	16q22

Tabla 5.7: Genes asociados a DC y patrones de herencia.

La distribución de los genes en este grupo fue bastante homogénea, distribuyéndose de forma parecida entre los genes *DKC1*, *RTEL1* y *TERT*. A todos los pacientes incluidos en este grupo se les había determinado previamente la longitud telomérica, siendo inferior al percentil 10 para la edad en todos los casos.

De las 8 mutaciones detectadas, 5 de ellas habían sido descritas en la literatura y bases de datos consultadas. Las características de cada una de las mutaciones se describen en la tabla 5.8.

GEN	HERENCIA	MUTACION	TIPO	REFERENCIA	CLASIFICACION ACMG MUTACIÓN NO DESCRITA
<i>DKC1</i>	HM	c.1163_1165del (p.388_389del)	<i>deletion</i>	Carrillo et al. 2012 ¹⁶⁶	
<i>DKC1</i>	HT	c.5C>T (p.A2V)	<i>missense</i>	Knight et al. 1999 ¹⁶⁷	
<i>DKC1</i>	HM	c.1141G>C (p.G381R)	<i>missense</i>	No descrita	Significado incierto
<i>RTEL1</i>	HT	c.1448G>T (p.S459I)	<i>missense</i>	No descrita	Significado incierto
<i>RTEL1</i>	HT	c.2992C>T (p.R998X)	<i>nosense</i>	Walne et al. 2013 ¹⁶⁸	
<i>RTEL1</i>	HM	c.2964T>G (p.F988L)	<i>missense</i>	Kannengiesser et al. 2015 ¹⁶⁹	
<i>TERT</i>	HT	c.3184G>A (p.A1062T)	<i>nosense</i>	Du et al. 2015 ¹⁷⁰	
<i>TERT</i>	HM	c.1990G>A (p.V664M)	<i>missense</i>	No descrita	Significado incierto

Tabla 5.8: Descripción de las mutaciones detectadas en el grupo de pacientes estudiados por Disqueratosis Congénita.

5.3.2.1.4 Síndrome Shwachman-Diamond (SSD)

De los 6 pacientes remitidos por sospecha de Síndrome Shwachman-Diamond, se diagnosticó tan solo un caso, por lo que la tasa diagnóstica en este grupo de pacientes ha sido del 16%. Se detectaron 2 mutaciones en heterocigosis confirmándose estar presentes en alelos distintos. Ambas mutaciones están ampliamente descritas en la literatura.

GEN	HERENCIA	MUTACION	TIPO	REFERENCIA
<i>SBDS</i>	HT	c.258+2T>C	splicing	Boocock et al. 2003 ¹⁷
	HT	c.183_184delTAinsCT (p.Lys62Ter)	indel	Boocock et al. 2003 ¹⁷

Tabla 5.9: Descripción de las mutaciones detectadas en el grupo de pacientes estudiados por síndrome de Shwachman-Diamond.

5.3.2.1.5 Trombopenia congénita (TC)

En el grupo compuesto por los pacientes remitidos por sospecha de trombopenia de origen congénito se incluyeron un total de 17 de los que finalmente se diagnosticaron 9. En este grupo se alcanzó tasa diagnóstica del 53%.

Aproximadamente la mitad de los pacientes con demostración molecular (4) fueron diagnosticados de Macrotrombopenia familiar asociada a *MYH9*, dos pacientes se diagnosticaron de Trombopenia asociada a *GP1Ba*, un paciente de Trombopenia asociada a *ITGA2B*, un paciente de TAR y un paciente fue rediagnosticado, siendo el diagnóstico final ABD tipo 1. La distribución de los genes afectados se muestra en la figura 5.8.

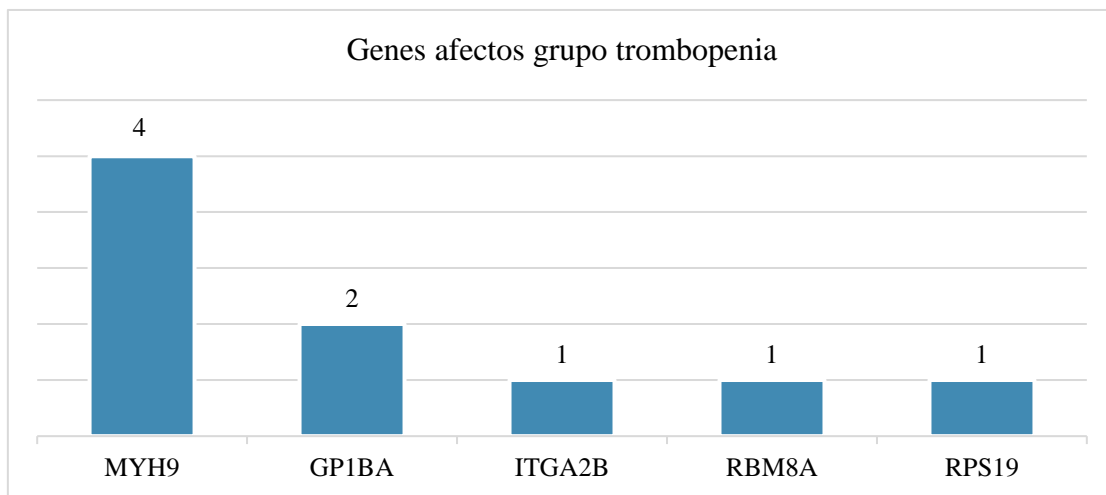


Gráfico 5.8: Distribución de los genes afectados en el grupo de trombopenias.

Las mutaciones detectadas en el gen *MYH9*, *ITGA2B* y *RPS19* se encontraron en heterocigosis, de acuerdo al patrón de herencia autosómica dominante descrito en las patologías asociadas a estos genes. Las mutaciones detectadas en el gen *GP1BA*, se detectaron en homocigosis, de acuerdo al patrón autosómico recesivo asociado a este gen. En el caso del gen *RBM8A*, que se detallará más adelante, se detectó una mutación en homocigosis (frecuencia alélica 80%) asociada a una microdelección del cromosoma 1, por lo que fue definido como hemicigosis.

De las 9 mutaciones detectadas, el 60% habían sido descritas en la literatura y bases de datos consultadas. El 90% de las mutaciones fueron de tipo *missense* y sólo un caso se trataba de una mutación en región de *splicing*.

GEN	HERENCIA	MUTACION	TIPO	REFERENCIA	CLASIFICACION ACMG MUTACIÓN NO DESCRITA
GPIBA	HM	c.916C> (p.R306C)	<i>missense</i>	No descrita	Significado incierto
	HM	c.916C> (p.R306C)	<i>missense</i>	No descrita	Significado incierto
ITGA2B	HT	c.3076C>T (p.R1026W)	<i>missense</i>	No descrita	Probablemente patogénica
MYH9	HT	c.3493C>T (p.R1165C)	<i>missense</i>	Pecci et al. 2008 ¹⁷¹	
	HT	c.3493C>T (p.R1165C)	<i>missense</i>	Pecci et al. 2008 ¹⁷¹	
	HT	c.3494G>T (p.R1165L)	<i>missense</i>	Savoia et al. 2010 ¹⁷²	
	HT	c.3494G>T (p.R1165L)	<i>missense</i>	Savoia et al. 2010 ¹⁷²	
RBM8A	HEM	c.*6C>G	<i>splicing</i>	No descrita	Significado incierto
RPS19	HT	c.164C>T (p.T55M)	<i>missense</i>	Da Costa et al. 2003 ¹⁷³	

Tabla 5.10: Descripción de las mutaciones detectadas en el grupo de pacientes estudiados por trombopenia congénita.

Paciente 10002: Diagnóstico de Trombopenia con ausencia de radio

El síndrome Trombopenia con ausencia de radio (TAR) se caracteriza por la reducción en el número de plaquetas y la ausencia del radio con preservación del pulgar. Estos pacientes presentan trombopenia como consecuencia de una disminución de megacariocitos en la médula ósea. La herencia de este síndrome se define como digénica, dado que en la mayoría de los pacientes coexisten una delección del cromosoma 1 en un alelo y una mutación en el gen *RBM8A* en el otro¹⁷⁴.

Descripción paciente 10002

Resumen historia clínica: paciente de 8 años de edad remitido para estudio por trombopenia desde los primeros años de vida y malformación bilateral de radios al nacimiento. No refieren antecedentes familiares de interés.

Hallazgos moleculares: En el estudio por NGS se detectó con una frecuencia alélica del 80% la mutación *6C>G en el gen *RBM8A*, confirmándose la presencia de la misma en homocigosis mediante Sanger (imagen 5.6 y 5.7). Clasificación ACMG: significado incierto.

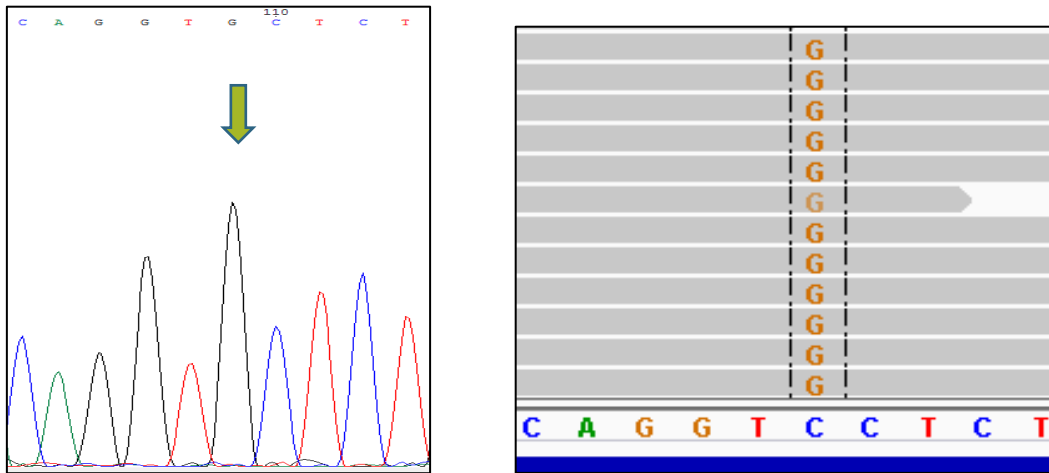


Imagen 5.6 y 5.7: Detección de la mutación *6C>G en el gen *RBM8A* mediante Sanger y NGS.

Dado este hallazgo y la clínica del paciente, se planteó la posibilidad de tratarse del síndrome TAR. Por ello, se revisó el estudio de CNVs realizado por NGS. En este estudio se detectó una pérdida de bases significativa en la región del cromosoma 1 que incluye el gen *RBM8A* (tabla 5.11).

<i>Chr</i>	<i>Start</i>	<i>End</i>	<i>Gene</i>	<i>Exon</i>	<i>Type</i>	<i>numBases</i>	<i>gain_loss</i>
chr1	145507651	145507750	no_info	no_info	CNV	99	loss
chr1	145507996	145508095	<i>RBM8A</i>	2	CNV	99	loss
chr1	145508196	145508295	<i>RBM8A</i>	3	CNV	99	loss
chr1	145508465	145508621	<i>RBM8A</i>	4	CNV	156	loss
chr1	145508906	145509062	<i>RBM8A</i>	5	CNV	156	loss
chr1	145509139	145509238	no_info	no_info	CNV	99	loss

Tabla 5.11: Datos obtenidos del análisis de CNVs donde se detecta pérdida de bases en el cromosoma 1 desde la posición 145507651 hasta 145509238 que incluye el gen *RBM8A*.

Tras realizar el estudio mediante microarrays de SNPs, se demuestra la presencia de una microdelección en el cromosoma 1 desde la posición 145395440 a 146089268 (imagen 5.8).

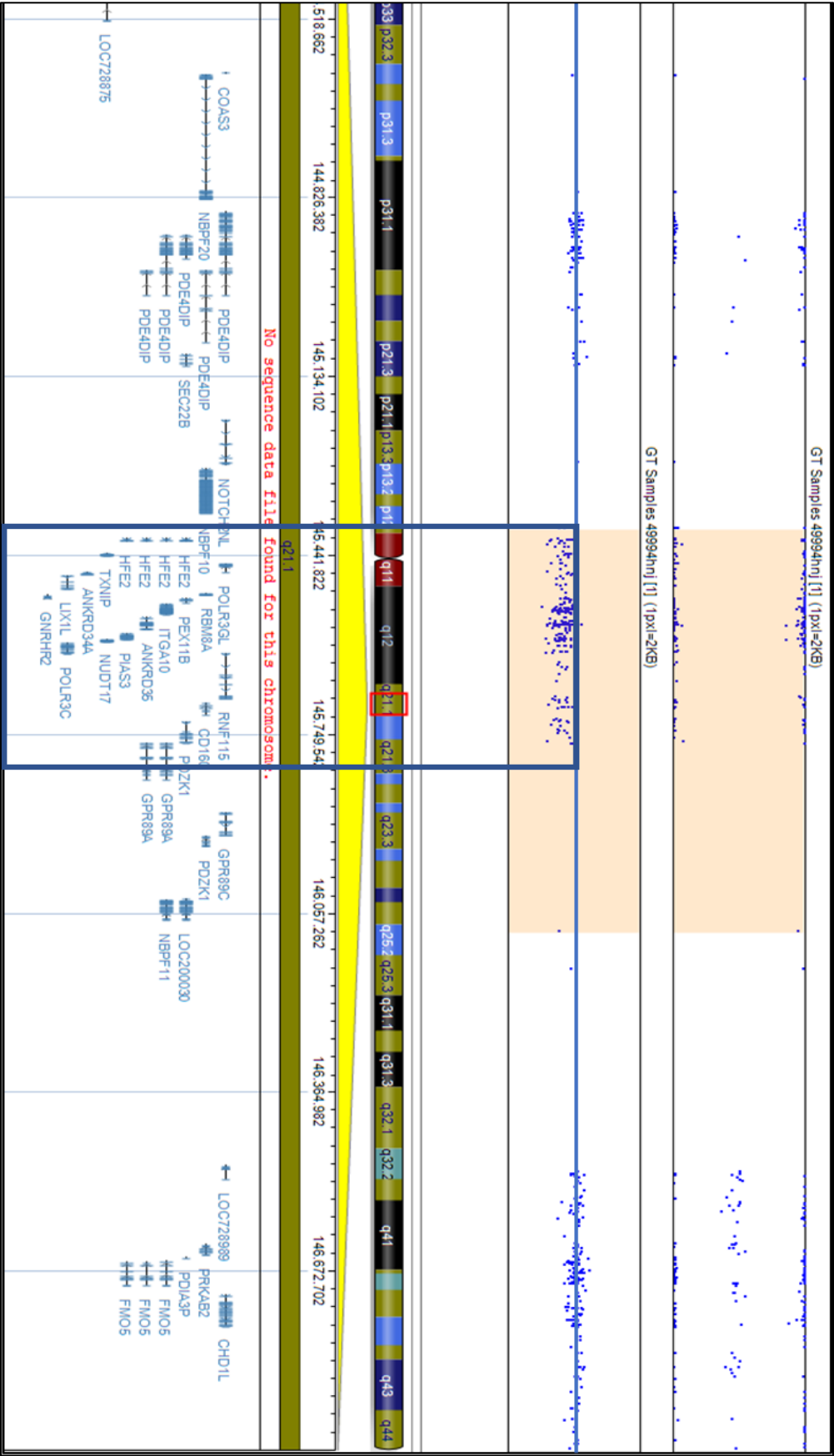


Imagen 5.8 Estudio realizado mediante arrays de SNPs, confirmandose la microdelección del cromosoma 1 que incluye el gen RBM8A.

Posteriormente, se realizó el estudio en los progenitores mediante NGS observándose que la mutación *6C>G en el gen *RBM8A* estaba presente en la rama paterna (imagen 5.9) y el estudio mediante CNVs mostró una pérdida de bases en el cromosoma 1 en la rama materna que incluía al gen *RBM8A* (imagen 5.10).

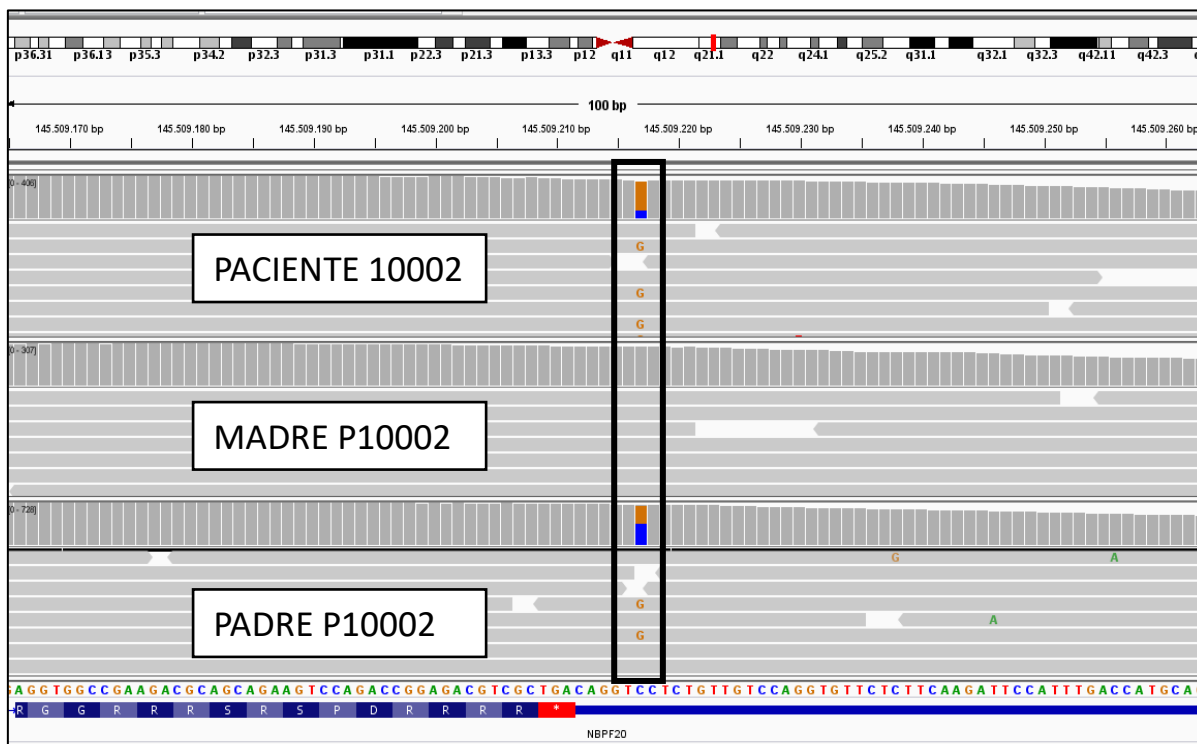


Imagen 5.9: Estudio NGS paciente y progenitores.

Chr	Start	End	Gene	Exon	Type	numBases	gain_loss
chr1	145507651	145507750	RBM8A	1	CNV	99	loss
chr1	145507996	145508095	RBM8A	2	CNV	99	loss
chr1	145508465	145508621	RBM8A	4	CNV	156	loss

Imagen 5.10: Estudio CNVs rama materna.

5.3.2.1.6 Neutropenias

En este grupo se incluyeron un total de 11 pacientes de los que se diagnosticaron 3, por lo que la tasa diagnóstica final fue del 27%. Estos 3 pacientes fueron diagnosticados de neutropenia congénita asociada a los genes *JAGN1*, *TCIRG1* y *ELANE*. La neutropenia asociada a *JAGN1* tiene un patrón de herencia AR, detectándose el cambio en homocigosis. En el caso de la neutropenia asociada al gen *ELANE*, el patrón de herencia es AD, encontrándose la mutación en heterocigosis tal como se indica en la tabla. Por otro lado, existen pocos casos publicados que asocien la neutropenia congénita grave a mutaciones en *TCIRG1*, sin embargo los que hay descritos en la literatura son de herencia AD y la mutación detectada en nuestro paciente se encuentra en heterocigosis, acorde a lo descrito en la literatura ¹⁷⁵. Esta es la única mutación de este grupo que no se ha encontrado descrita en las bases de datos consultadas.

GEN	HERENCIA	MUTACION	TIPO	REFERENCIA	CLASIFICACIÓN ACMG
<i>JAGN1</i>	HM	c.3G>A (p.M1I)	<i>missense</i>	Boztug et al. 2014 ¹⁷⁶	
<i>TCIRG1</i>	HT	c.2206C>T (p.R736C)	<i>missense</i>	No descrita	Significado incierto
<i>ELANE</i>	HT	c.377C>T (p.S126L)	<i>missense</i>	Dale et al. 2000 ¹⁷⁷	

Tabla 5.12: Descripción de las mutaciones detectadas en el grupo de pacientes estudiados por neutropenia congénita.

5.3.3 Resultados del grupo FMI

Del total de pacientes aptos para el análisis (125), 29 se incluyeron en el grupo denominado FMI (23.2%). El diagnóstico molecular en este grupo se alcanzó en 7 de los 29 pacientes, con un ratio diagnóstico del 24%. A continuación, se detallan los diagnósticos realizados en cada uno de los casos.

5.3.3.1 Caso 1: pacientes 08001 y 08003

❖ Resumen historia clínica:

a) El paciente 08001 fue remitido por pancitopenia leve detectada en la infancia que fue empeorando progresivamente hasta considerarse grave a la edad de 22 años, que es cuando se realiza el estudio. Además de la afectación medular, el paciente presentaba anomalías físicas como retinopatía exudativa con amaurosis de ojo derecho y distrofia ungueal. Como antecedentes familiares, su padre (paciente 08003) había sido trasplantado de pulmón por fibrosis pulmonar idiopática. Su hermana (paciente 08002) presentaba una anemia de carácter leve y características macrocíticas. La madre (08004) no presentaba ninguna patología.

b) El paciente 08003 de 55 años de edad fue remitido por anemia leve y sospecha de fallo medular congénito. Como antecedentes destaca un trasplante pulmonar realizado por fibrosis pulmonar idiopática en la segunda década de la vida. Como antecedentes familiares, su hijo (paciente 08001) se encontraba en estudio por pancitopenia. Su hija (paciente 08002) presentaba una anemia de carácter leve y características macrocíticas.

❖ Hallazgos moleculares: Ante la sospecha de una patología familiar, se realiza el estudio mediante NGS a los pacientes 08001, 08002 y 08003 con los siguientes resultados:

- En los tres casos (08001, 08002 y 08003) se detecta la mutación tipo *missense* c.251T>A (p.V84E) en heterocigosis en el gen *TERT*, asociado

al desarrollo de Disqueratosis Congénita (imagen 5.11). Dicha mutación no había sido descrita en las bases de datos ni literatura consultada. Clasificación ACMG: VOUS. En el caso del gen *TERT* se han descrito formas tanto de Disqueratosis como fibrosis pulmonar idiopática con patrones de herencia dominantes y recesivos^{45 178}.

- En los pacientes 08001 y 08003 se detecta además la mutación c.3128 A>G (p.Q1043R) en heterocigosis en el gen *RTEL1*(imagen 5.12), relacionado también con formas de DC y FPI tanto de herencia recesiva como dominante^{55 52 179}. Esta mutación tampoco ha sido descrita en la literatura ni en las bases de datos consultadas. Clasificación ACMG: VOUS.

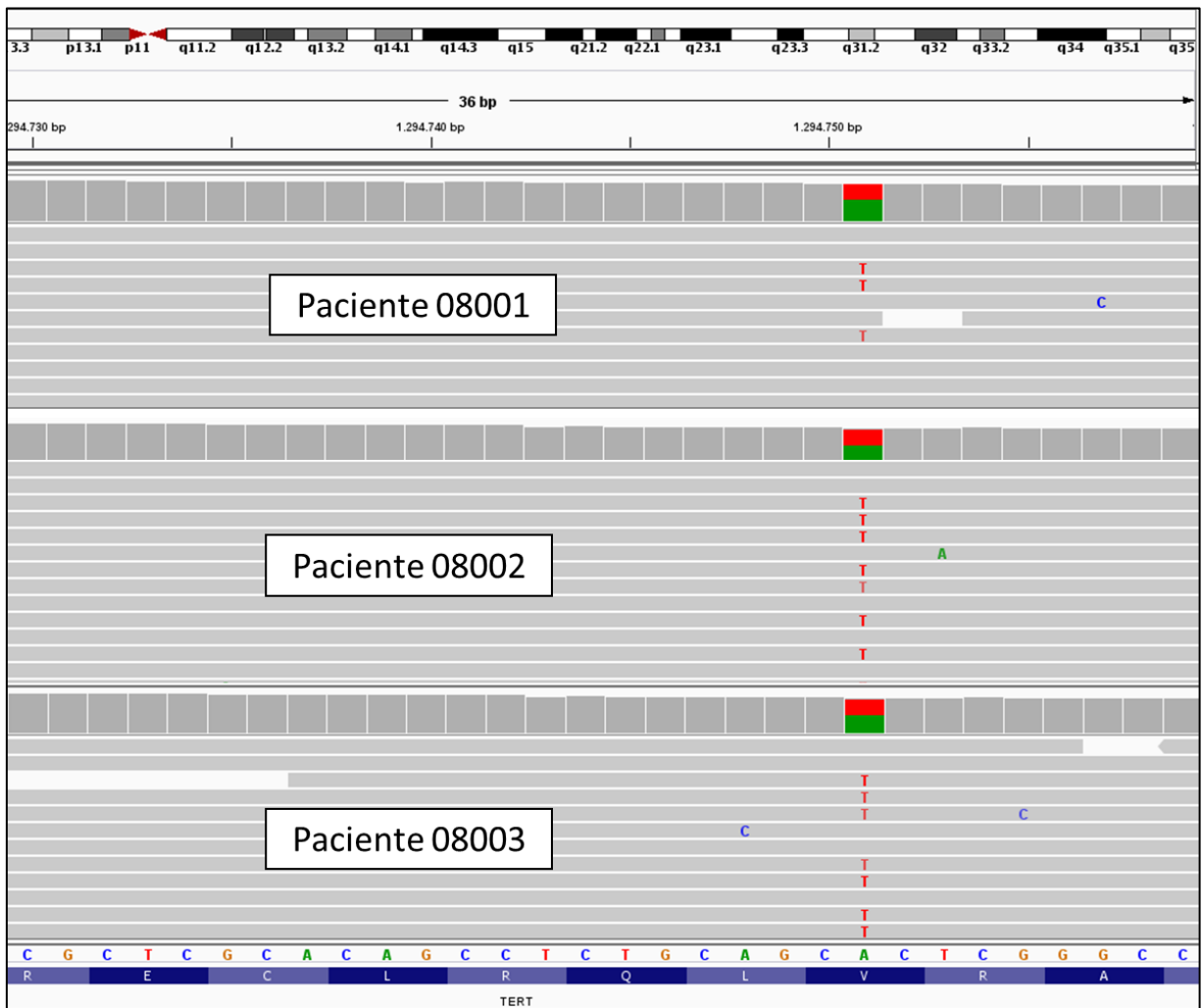


Imagen 5.11: Estudio NGS en los pacientes 08001, 08002 y 08003 donde se observa la presencia de la mutación c.251A>T en el gen *TERT* en heterocigosis en los tres casos.

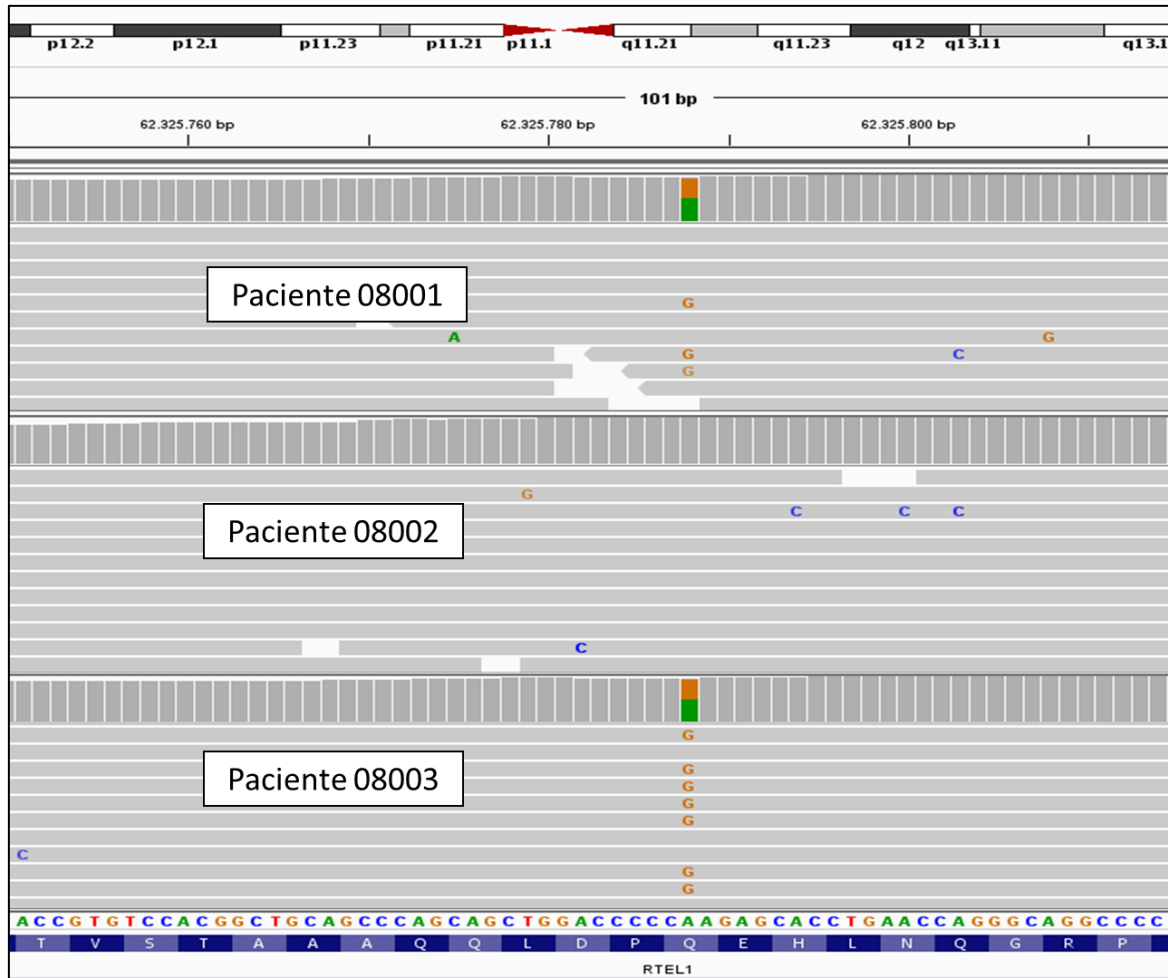


Imagen 5.12: Estudio NGS en los pacientes 08001, 08002 y 08003 donde se observa la presencia de la mutación c.3128 A>G en el gen *RTEL1* en 08001 (hijo afecto) y 08003 (padre afecto).

Por tanto, el árbol familiar quedaría de la siguiente manera, una vez confirmadas las mutaciones en toda la familia (figura 5.1)

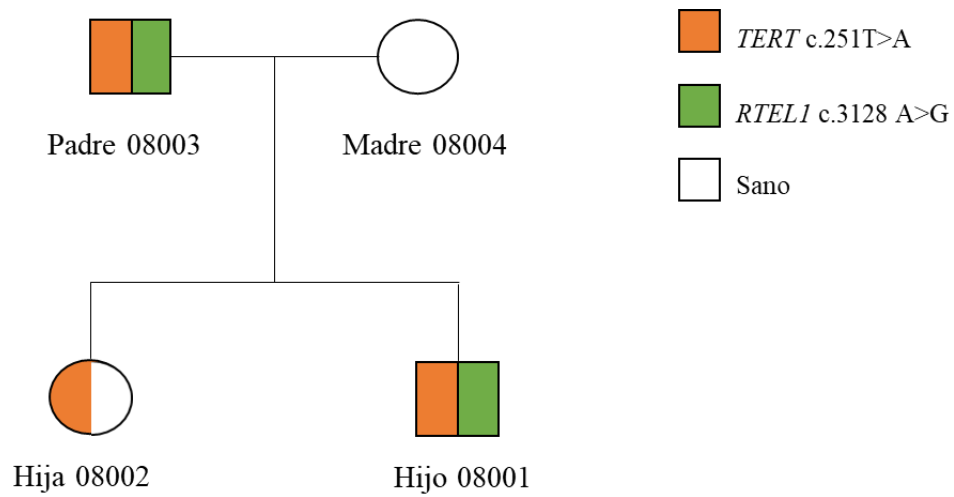


Figura 5.1: Representación esquematizada de las mutaciones presentes en la familia.

Ante la alta sospecha de una familia afecta de telomeropatía se procedió a realizar el estudio de longitud telomérica en toda la familia para confirmar la implicación de las mutaciones detectadas. Para ello se obtuvo DNA extraído de sangre periférica, realizándose el estudio de longitud de telómeros mediante *southern blot* en toda la familia (tabla 5.13).

PACIENTE	EDAD	GRADO FAMILIAR	PATOLOGÍA	LT	PERCENTIL
08003	55	Padre	Fibrosis pulmonar	6.1 Kbp	<p1 para su edad
08004	54	Madre	Sana	13 Kpb	Normal para su edad
08001	22	Hijo	Aplasia medular grave	5.5 Kpb	<p1 para su edad
08002	30	Hija	Macrocitosis	8 Kbp	p50 para su edad

Tabla 5.13: Datos del estudio de longitud telomérica familiar

❖ Conclusión:

Dada la concordancia clínica con los hallazgos moleculares y de laboratorio, finalmente ambos pacientes eran compatibles con el diagnóstico de telomeropatía.

5.3.3.2 Caso 2: paciente 20001

❖ Resumen historia clínica:

Se remite al paciente para estudio molecular por neutropenia grave ($<0,5 \times 10^9/L$) e hipopigmentación mucocutánea. Refiere episodios infecciosos de repetición. Como antecedentes familiares no describen patología. Los progenitores son primos.

❖ Hallazgos moleculares:

En la secuenciación se detecta la mutación c.2757delA (p.I919fs) en homocigosis en el gen *AP3B1* (imágenes 5.13 y 5.14). Esta mutación no está descrita en la literatura ni en las bases de datos consultadas. Según la clasificación ACMG se considera “probablemente patogénica”. Se trata de una variante tipo *frameshift* que afecta a la subunidad beta-1 del complejo proteico AP3. Las alteraciones en este complejo proteico es un mecanismo conocido de enfermedad conocida como Síndrome de Hermansky-Pudlak tipo 2.

❖ Conclusión:

Por tanto, dado que el paciente presenta clínica típica de alteraciones en este gen, la herencia de la enfermedad es AR y la mutación está en homocigosis y la clasificación es “probablemente patogénica”, consideramos que la mutación puede ser causante de su patología.

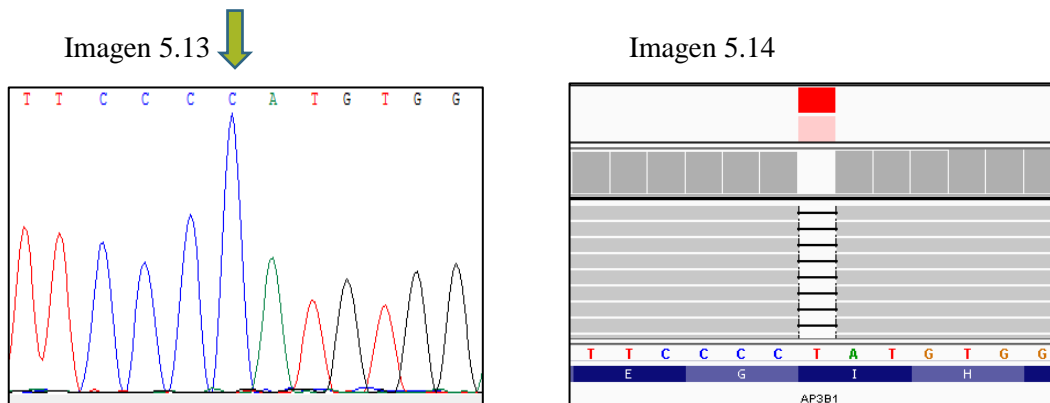


Imagen 5.13 y 5.14: Detección de la mutación c.2757delA en el gen *AP3B1* mediante Sanger (imagen 5.11) y NGS (imagen 5.12).

5.3.3.3 Caso 3: paciente 23001

❖ Resumen historia clínica:

Se remite al paciente para estudio molecular por sospecha de fallo medular congénito. Analíticamente, el paciente presenta pancitopenia grave (Hb: 7 gr/dL, plaquetas $5 \times 10^9/L$ y neutrófilos $0.7 \times 10^9/L$) acompañada de hipoplasia medular. Como antecedentes familiares no describen patologías. Los progenitores son primos.

❖ Hallazgos moleculares:

En la secuenciación se detecta la mutación tipo *missense* c.133T>C (p.F45L) en homocigosis en el gen *MPL* (imágenes 5.15 y 5.16). Esta mutación no está descrita en la literatura ni en las bases de datos consultadas. Según la clasificación ACMG se considera *VOUS*. Se realiza el análisis *in silico* (tabla 5.14) en el que todos los predictores de patogenicidad indican que dicha mutación podría producir una proteína truncada:

CADD	CADD.Pred	Sift	Sift.Pred	Polyphen2	Polyphen2.Pred
23.0	Damaging s>=14	0.0561	Damaging s<=0.06	0.996	Damaging s>=0.3
MutAssesor	MutAssesor.Pred	Fathmm	Fathmm.Pred	VEST	VEST.Pred
1.275	Possibly Damaging s in [1.12,1.8)	-0.12	Possibly Damaging s in (-1,0.8]	0.744	Damaging s>=0.65

Tabla 5.14: Resultados del análisis *in silico*

Imagen 5.15

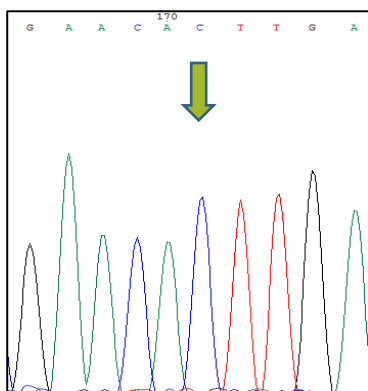


Imagen 5.16

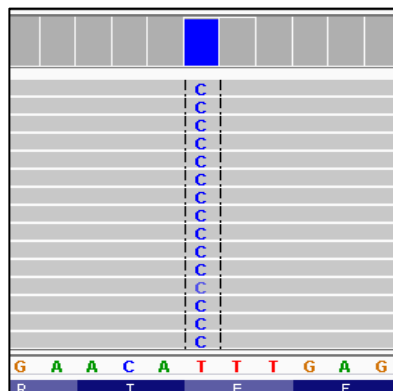


Imagen 5.15 y 5.16: Detección de la mutación c.133T>C en el gen *MPL* mediante Sanger (imagen 5.15) y NGS (imagen 5.16).

❖ Conclusión:

El paciente presenta clínica que concuerda con lo descrito en el desarrollo de TAC, patología asociada a mutaciones en el gen *cMPL*. La herencia de la enfermedad es AR y la mutación está en homocigosis. No obstante, la clasificación es VOUS, pero todos los predictores de patogenicidad apuntan a que la proteína podría estar afectada. Por tanto, consideramos que la mutación puede ser causante de su patología.

5.3.3.4 Caso 4: paciente 10003

❖ Resumen historia clínica:

Se remite al paciente para estudio molecular por bicitopenia. Analíticamente, el paciente presenta sobre todo trombopenia de $36 \times 10^9/L$ y discreta neutropenia con cifras en torno a $1 \times 10^9/L$. Dicha bicitopenia se acompaña de hipoplasia medular. No se conocen los antecedentes familiares de la paciente.

❖ Hallazgos moleculares:

En el estudio molecular se detectan dos mutaciones en heterocigosis en el gen *MPL*: c.754T>C (p.Y252H) y c.1000T>C (p.C334R). Ambas mutaciones han sido clasificadas según la clasificación ACMG como “*de significado incierto*”. Se realiza el análisis *in silico* (tabla 5.15 y 5.16) en el que todos los predictores de patogenicidad indican que ambas mutaciones podrían producir una proteína truncada:

Mutación 1: c.754T>C (p.Y252H)

CADD	CADD.Pred	Sift	Sift.Pred	Polyphen2	Polyphen2.Pred
25.8	Damaging s>=14	0.005	Damaging s<=0.06	0.997	Damaging s>=0.3
MutAssesor	MutAssesor.Pred	Fathmm	Fathmm.Pred	VEST	VEST.Pred
2.36	Damaging s>=1.8	-3.67	Damaging s<=-1	0.797	Damaging s>=0.65

Tabla 5.15: Resultados del análisis *in silico*

Imagen 5.17

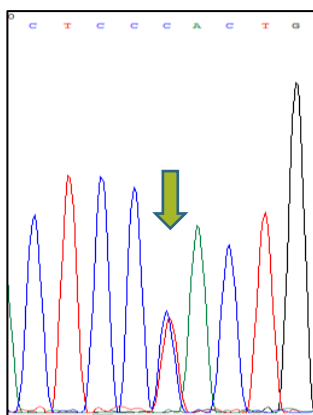


Imagen 5.18

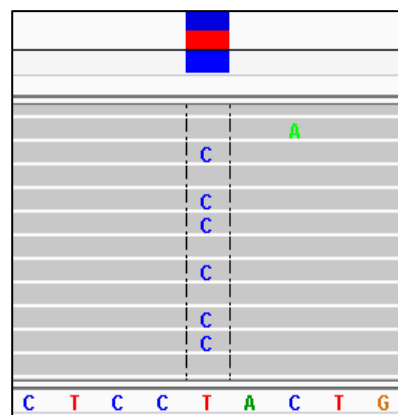


Imagen 5.17 y 5.18: Detección de la mutación c.754T>C en el gen *MPL* mediante Sanger (imagen 5.17) y NGS (imagen 5.18).

Mutación 2: c.1000T>C (p.C334R)

CADD	CADD.Pred	Sift	Sift.Pred	Polyphen2	Polyphen2.Pred
25.0	Damaging s>=14	0.0	Damaging s<=0.06	0.999	Damaging s>=0.3
MutAssesor	MutAssesor.Pred	Fathmm	Fathmm.Pred	VEST	VEST.Pred
2.125	Damaging s>=1.8	-2.16	Damaging s<=-1	0.892	Damaging s>=0.65

Tabla 5.16: Resultados del análisis *in silico*

Imagen 5.19

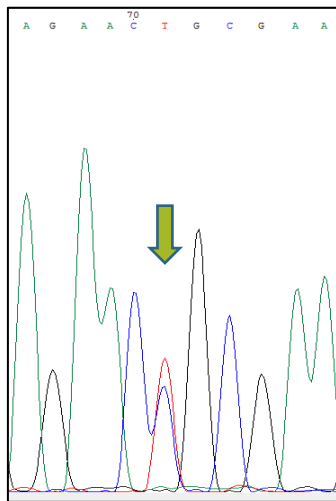


Imagen 5.20

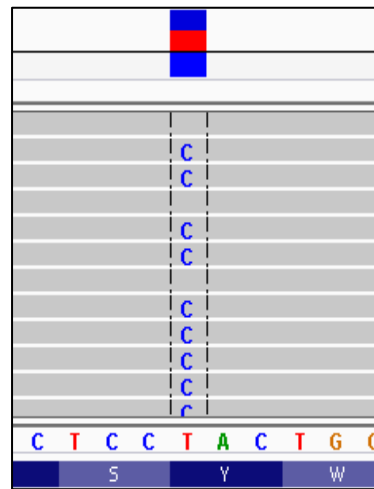


Imagen 5.19 y 5.20: Detección de la mutación c.1000T>C en el gen *MPL* mediante Sanger (imagen 5.17) y NGS (imagen 5.18).

❖ **Conclusión:**

El gen *MPL* que codifica para el receptor de la trombopoyetina (THPO; 600044), un factor de crecimiento hematopoyético que regula la producción de células progenitoras hematopoyéticas multipotentes y plaquetas. Mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta en este gen dan lugar al desarrollo de TAC.

El paciente presenta clínica concordante con lo descrito en esta patología, la herencia de la enfermedad es AR y el paciente es doble heterocigoto. No obstante, la clasificación de ambas mutaciones según ACMG es VOUS, pero todos los predictores de patogenicidad apuntan a que la proteína podría estar afectada. Por tanto, consideramos que la mutación puede ser causante de su patología.

5.3.3.5 Caso 5: paciente 21001

❖ Resumen historia clínica:

Se remite al paciente para estudio molecular por pancitopenia grave (Hb: 6 gr/dL, plaquetas $13 \times 10^9/L$ y neutrófilos $1 \times 10^9/L$) acompañada de hipoplasia medular. Como antecedentes familiares no describen patologías.

❖ Hallazgos moleculares:

En la secuenciación se detecta la mutación tipo *missense* c.2603C>T (p.P868L) en homocigosis en el gen *BLM*. Esta mutación ha sido descrita previamente en la literatura, definiéndose como una mutación que podría asociar un fenotipo “*Bloom like*” pudiendo relacionarse con una elevada toxicidad a quimioterápicos¹⁸⁰.

Imagen 5.21

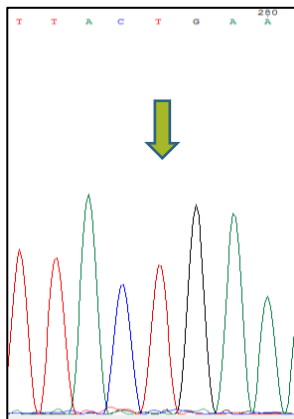


Imagen 5.22

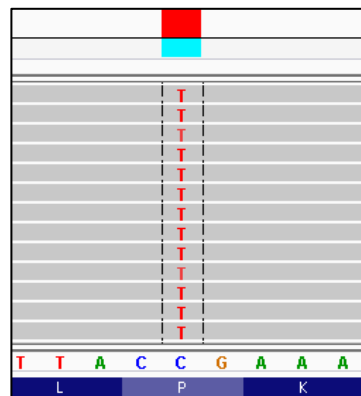


Imagen 5.21 y 5.22: Detección de la mutación c.2603C>T en el gen *BLM* mediante Sanger (imagen 5.21) y NGS (imagen 5.22).

❖ Conclusión:

El gen *BLM/RECQL3* codifica para la proteína helicasa *RECQL3*. Mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta dan lugar al desarrollo del Síndrome de Bloom¹⁸¹¹⁸². En la literatura sólo hay descrito un caso y no está bien definido clínicamente, por tanto, dado el hallazgo de la mutación en homocigosis y las implicaciones clínicas que podría tener esta mutación, se consideró que podría tener algún papel en la patología del paciente.

5.3.3.6 Caso 6: paciente 01015

❖ Resumen historia clínica:

Paciente remitida para estudio por bicitopenia (anemia y trombopenia leves) y antecedentes de osteosarcoma. No refieren antecedentes familiares.

❖ Hallazgos moleculares:

En el estudio molecular se han detectado dos mutaciones en heterocigosis en el gen *RECQL4*: c.1048_1049del (p.R350fs) (imagen 5.23) y c.1397C>A (p.P466L) (imagen 5.24). Ambas mutaciones han sido descritas en la literatura asociadas al desarrollo del Síndrome de Rothmund Thompson¹⁸³.

Imagen 5.23

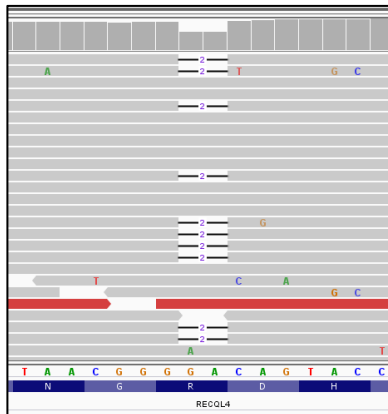


Imagen 5.24

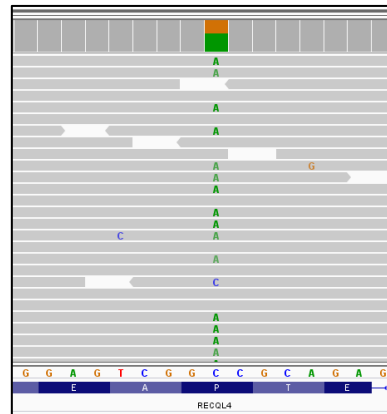


Imagen 5.23 y 5.24: Detección de las mutaciones c.1048_1049del y c.1397C>A en el gen *RECQL4* mediante NGS.

❖ Conclusión:

El síndrome de Rothmund-Thomson es un trastorno autosómico recesivo caracterizado por atrofia de la piel, telangiectasia, hiper e hipopigmentación, anomalías congénitas esqueléticas, talla baja, envejecimiento prematuro y aumento del riesgo de enfermedades malignas¹⁸⁴ (20503338). Típicamente se asocia a mutaciones en heterocigosis compuesta en el gen *RECQL4*. Por tanto, dado que el paciente presenta clínica típica de alteraciones en este gen, la herencia de la enfermedad coincide y las mutaciones han sido ampliamente descritas en la literatura, esta paciente fue finalmente diagnosticado de Síndrome Rothmund-Thompson.

5.3.4 Correlación entre motivo de estudio y diagnóstico molecular

Dentro del grupo FMD la correlación fue adecuada en todos los pacientes excepto en uno, con lo que en este grupo tendríamos una tasa de rediagnóstico del 1,8%.

En todos los pacientes diagnosticados que habían sido remitidos por sospecha de DC, ABD, FA y neutropenia, la alteración molecular detectada fue coincidente con la sospecha clínica. Sin embargo, en el grupo de pacientes remitidos por trombopenia, hubo un caso en el que se detectó una mutación asociada al desarrollo de ABD. En este caso, se revisó la historia del paciente y se observó que tenía datos de episodios de anemia en la infancia. Además, el episodio de trombopenia fue transitorio, recuperándose de forma espontánea. Por tanto, al coincidir el cuadro clínico con la alteración molecular detectada, el paciente fue diagnosticado finalmente de ABD.

En el grupo FMI, donde fueron diagnosticados un total de 7 pacientes, tanto los motivos de estudio como los diagnósticos finales fueron muy heterogéneos (tabla 5.17). Sin embargo, como ya se ha ido comentando caso por caso en el apartado anterior, en todos los casos las características clínicas de los pacientes se correlacionan adecuadamente con la alteración molecular detectada.

MOTIVO DE ESTUDIO	PACIENTE	DIAGNÓSTICO FINAL
Anemia	08003	Disqueratosis congénita
Bicitopenia	10003	TAC
Bicitopenia	01015	Síndrome Rothmund-Thomson
Fallo medular	23001	TAC
Neutropenia e hipopigmentación	20001	Síndrome Hermansky Pudlak
Pancitopenia	21001	Bloom like
Pancitopenia	08001	Disqueratosis congénita

Tabla 5.17: Motivos de estudio y diagnóstico molecular realizado en los pacientes del grupo FMI.

5.3.5 Análisis de pacientes no diagnosticados

De los 115 pacientes sin diagnóstico molecular analizados mediante NGS, no han sido diagnosticados un total de 64, correspondiendo al 55% del total de la muestra, tal y como se refleja en el gráfico 5.9. Un 60% de estos pacientes corresponden al grupo FMD. La distribución de los pacientes FMD según el subgrupo se puede observar en el gráfico 5.10.

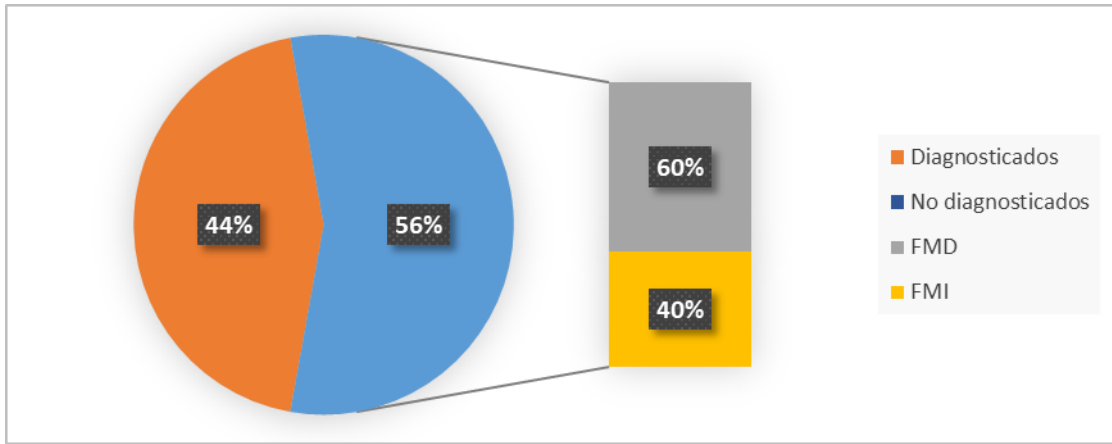


Gráfico 5.9: Distribución de pacientes sin diagnóstico molecular.

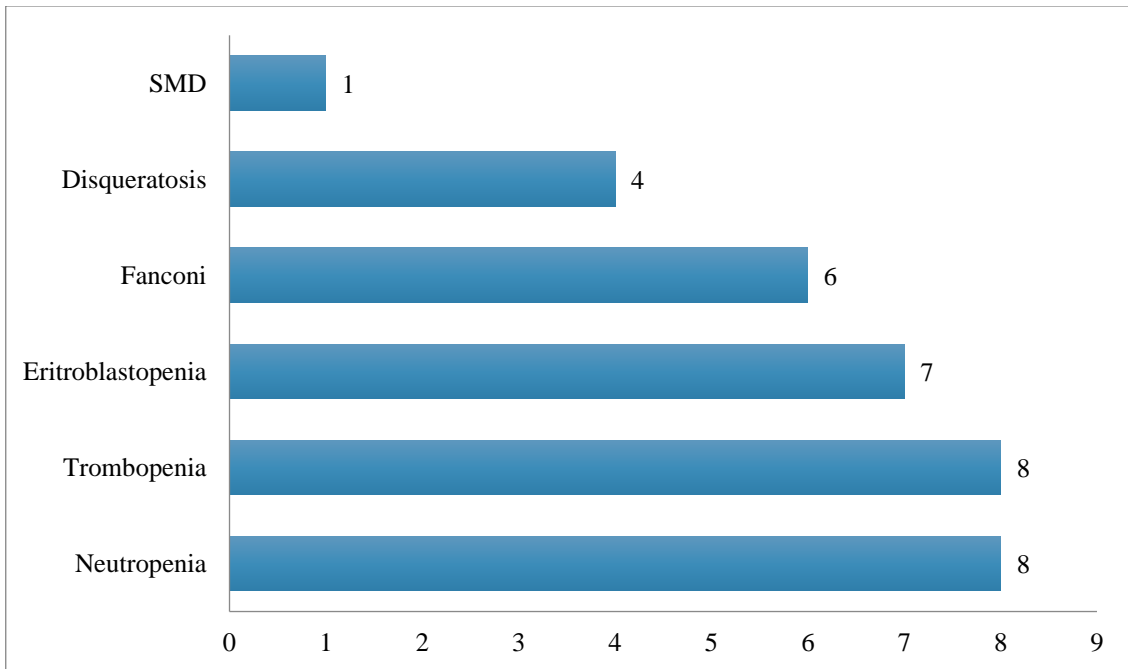


Gráfico 5.10: Distribución de pacientes sin diagnóstico molecular en el grupo FMD

A los dos años del reclutamiento de estos pacientes, se ha reinterrogado a los médicos responsables de los mismos sobre la evolución clínica. El flujo de pacientes no diagnosticados se puede ver detallado en la figura 5.2.

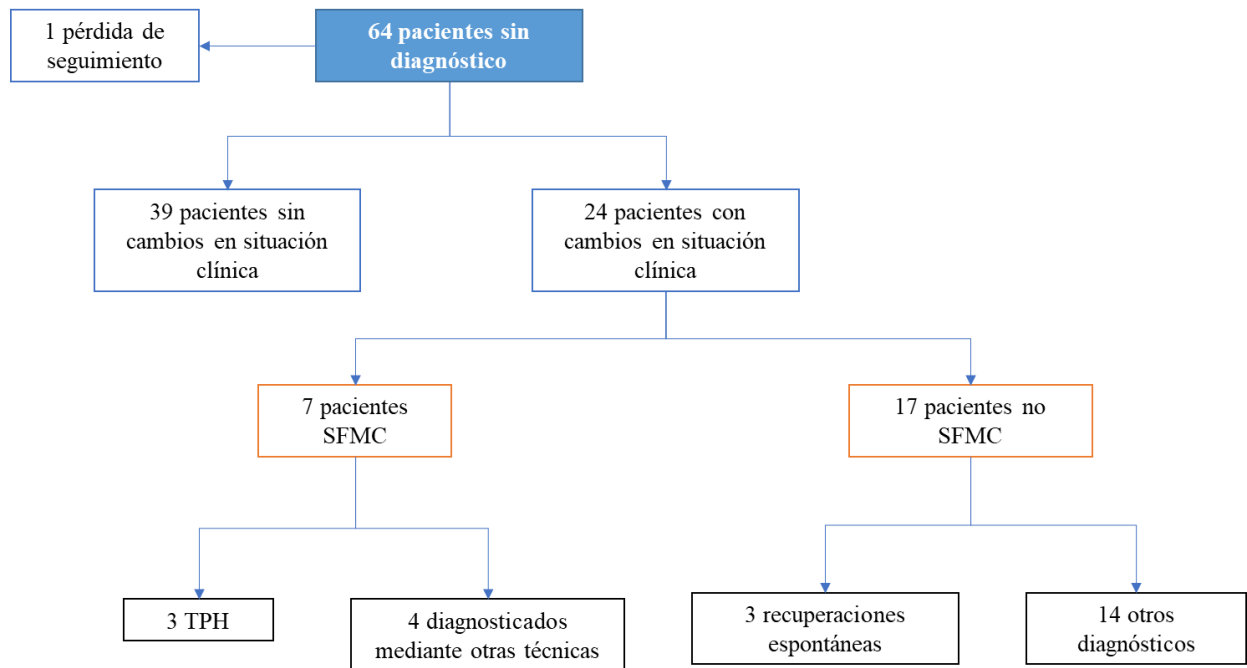


Figura 5.2: Algoritmo en el que se detalla la evolución clínica de los pacientes no diagnosticados.

En un caso se produjo una pérdida de seguimiento. De estos pacientes un 60% (39) no han presentado cambios clínicos ni se ha alcanzado ningún diagnóstico molecular, manteniéndose la sospecha de SFMC hasta la fecha. El 40% restante (24) ha tenido evoluciones muy diversas, pero se pueden observar dos grupos bien definidos.

El primero está constituido por 7 pacientes afectados por SFCM. De estos pacientes, 3 han sido receptores de TPH, entre los que falleció uno de ellos por complicaciones del procedimiento. En los 4 casos restantes, se ha alcanzado el diagnóstico molecular de SFMC mediante otras técnicas que se resumen en la tabla 5.18.

SOSPECHA DIAGNÓSTICA	ALTERACIÓN MOLECULAR	TÉCNICA MOLECULAR	DIAGNÓSTICO FINAL
Eritroblastopenia	Deleción 15q	CGH-array	Anemia de Blackfan Diamond
Shwachman-Diamond	Mutación DNAJC21	Secuenciación del exoma	SSD asociado a DNAJC21
Bicitopenia	Mutación SAMD9	Secuenciación del exoma	SMD asociado a SAMD9
Anemia de Fanconi	Deleción exones gen FANCA	MPLA	Anemia de Fanconi

Tabla 5.18: Pacientes afectados de SFMC diagnosticados mediante otras técnicas moleculares

De los 17 casos restantes (26%), 3 pacientes han tenido recuperaciones hematológicas espontáneas sin necesidad de tratamiento y los 14 restantes han sido diagnosticados de otras patologías. Estos diagnósticos se pueden ver resumidos en la tabla 5.19.

Patología	Número de pacientes
Citopenias de origen inmune	7
Inmunodeficiencia	2
Déficit piruvato quinasa	1
Aplasia medular adquirida	1
Citopenia refractaria de la infancia	1
Sospecha de enfermedad mitocondrial	1
Síndrome mielodisplásico con monosomía del cromosoma 7	1

Tabla 5.19: Relación de diagnósticos de pacientes no SFMC

6. DISCUSIÓN

En este proyecto se ha analizado el rendimiento diagnóstico que aportan las herramientas de secuenciación masiva de paneles de genes en el estudio de los SFMC. Esta idea parte de la premisa de que alcanzando un diagnóstico molecular rápido y certero puede mejorarse sustancialmente el manejo terapéutico y el seguimiento de estos pacientes.

Este trabajo reunía inicialmente dos intereses prácticos, el primero intentar dar servicio diagnóstico y segundo, recabar información sobre estas patologías. Por este motivo, el estudio plantea incluir en el análisis todas aquellas muestras de pacientes en los que su médico especialista sospecha el diagnóstico de SFMC, sin ningún otro criterio de exclusión. Hasta el inicio de este proyecto, desde el punto de vista práctico, resultaba extremadamente complejo poder tener a disposición de los hospitales una herramienta de alto rendimiento que proporcionara el diagnóstico molecular de estos pacientes. Por tanto, este estudio surge de la necesidad de tener una plataforma centralizada que permita la detección molecular de estos pacientes, además de poder sentar las bases iniciales de un posible registro a nivel nacional.

Siendo evidentes algunas debilidades metodológicas inherentes al proceso de reclutamiento de este trabajo, no es menos cierto que de esa forma hemos conseguido conformar una red centralizada permitiendo realizar el estudio molecular, tan necesario en este tipo de patologías congénitas.

En relación con las características de la serie, cabe destacar que los principales trabajos publicados que estudian alteraciones moleculares en SFMC se centran en patologías concretas como AF^{185 186} o ABD¹⁸⁷. En el presente estudio se han realizado diferentes análisis, por un lado se ha analizado la capacidad diagnóstica en la serie global, y por otro lado separadamente en los subgrupos de patologías específicas. Esta división puede aportar tanto la visión general de todos los SFMC como de los diferentes subgrupos en los que se han clasificado los pacientes. En este sentido, quizás una de las limitaciones más notables en nuestra cohorte sea el tamaño muestral. Es posible que sea necesario un número mayor para intentar definir prevalencias, tanto de patologías como de genes y mutaciones asociados a las mismas, tal y como han reportado otros estudios disponibles en la literatura¹⁴¹.

El interés suscitado en los últimos años por las técnicas de secuenciación masiva

ha impulsado el desarrollado de nuevos métodos de análisis que permiten realizar el diagnóstico molecular de forma rápida y eficaz de patologías con un número elevado de genes candidatos. Hasta hace pocos años, la secuenciación directa por el método de Sanger ha sido el principal procedimiento de búsqueda de mutaciones. Sin embargo, ya había sido reportado en la literatura que herramientas de secuenciación masiva, como los paneles de genes o WES, podían ser útiles en el diagnóstico molecular de enfermedades monogénicas, como son los SFMC. Es este el motivo por el que se escogió diseñar un panel de genes que incluyera todos aquellos descritos hasta 2015 para identificar las principales alteraciones moleculares en los SFMC.

6.2 Capacidad de detección del panel

Tras evaluar el rendimiento diagnóstico de esta herramienta mediante un panel NGS de genes asociado a fallos medulares congénitos, se ha podido comprobar que esta herramienta diagnóstica es sensible y específica para la detección de alteraciones moleculares en pacientes afectos de SFMC, ya que todos los controles positivos fueron detectados y todas las alteraciones moleculares testadas mediante Sanger fueron confirmadas.

Excluyendo del análisis los controles positivos, se analizaron un total de 115 muestras de pacientes con sospecha de SFMC sin diagnóstico molecular previo. De la muestra total, se detectaron mutaciones compatibles con el fenotipo del paciente en 51 de los mismos, alcanzando una tasa de detección del 44%. Estos resultados son similares a los obtenidos por parte de otros grupos. En concreto, sólo hay publicados dos trabajos con aproximaciones similares. En ambas series, estudian pacientes con sospecha de SFMC mediante un panel NGS y analizan la rentabilidad diagnóstica del mismo. El primero publicado es el realizado por Ghemlas y colaboradores¹³⁸ en el que la tasa diagnóstica global fue del 38%, diagnosticándose 61 de los 158 pacientes estudiados. Por otro lado, en el estudio realizado por el grupo japonés, Muramatsu y colaboradores¹⁴¹ alcanzan una tasa diagnóstica del 44%.

Las tasas de detección pueden variar entre grupos debido a diferentes motivos. Por un lado, el número de genes incluidos por panel puede ser determinante, es decir, a mayor número de genes incluidos, mayor capacidad de poder detectar variantes. En nuestro caso, el total de genes incluidos fue de 128, a diferencia de la aproximación realizada por Ghemlas, en el que se incluyó un total de 72 genes. Entre nuestros resultados y los del grupo canadiense liderado por Ghemlas, se puede observar una discreta diferencia, siendo algo mejor la tasa de detección de este trabajo con un porcentaje del 44% frente al 38% del grupo de Ghemlas. Viendo esta diferencia, el rendimiento diagnóstico puede mejorarse incluyendo un mayor número de genes por panel. Sin embargo, si realizamos la misma comparativa con el grupo de Muramatsu podemos ver que las tasas de diagnóstico son idénticas (44%). Este grupo incluyó un número de genes mayor al de este trabajo, 184 y 128 respectivamente, lo que puede hacer pensar que el número de genes incluidos por panel no sea determinante en el porcentaje

de diagnósticos alcanzados mediante esta herramienta. Una explicación posible es que los paneles que incluyen un número mayor de genes son los que se han diseñado más recientemente incluyendo genes descubiertos en los últimos años y consecuentemente menos testados en la población. Por tanto, al ser esta aproximación algo similar a un *screening*, lo más probable es que la gran mayoría de los pacientes estén dentro del grupo de genes más frecuentemente detectados en pacientes con SFMC.

Por otra parte, la diferencia podría residir en la selección de pacientes. En este trabajo, se han incluido todos los pacientes que a criterio de su médico especialista responsable tenían diagnóstico clínico de SFMC. Este criterio de selección es muy similar al del grupo japonés de Muramatsu que incluyen un total de 121 pacientes que fueron clínicamente diagnosticados de SFMC en el hospital de Nagoya y otros centros nacionales. Debido a esta selección de los casos, podemos encontrarnos con que muchos de ellos finalmente no sean patologías congénitas, por lo que podríamos tener una tasa mayor de estudios negativos que otros grupos que hayan realizado un mayor filtrado de los pacientes. En el caso del trabajo de Ghemlas, los pacientes estudiados mediante la plataforma NGS fueron seleccionados del registro canadiense de fallo medular congénito en el que participan 17 instituciones. En este registro se incluyen aquellos pacientes con evidencia de fallo medular asociado a antecedentes familiares, malformaciones físicas, presentación anterior al año de vida o pruebas genéticas positivas. Al incluir pacientes con criterios claros de SFMC, este grupo debería tener unos resultados mejores, sin embargo son similares e incluso inferiores, lo que podría indicar que existe un porcentaje desconocido de pacientes afectados de SFMC que no presentan fenotipos típicos o estos son más leves.

Otro punto a tener en cuenta es la sistemática a seguir a la hora de realizar el filtrado y análisis de variantes. En este trabajo se ha seguido el esquema de filtrado del grupo de Ghemlas (figura 6.1) y se ha realizado la clasificación de las mismas según las indicaciones de la ACMG, tal y como ha sido descrito en el apartado material y métodos.

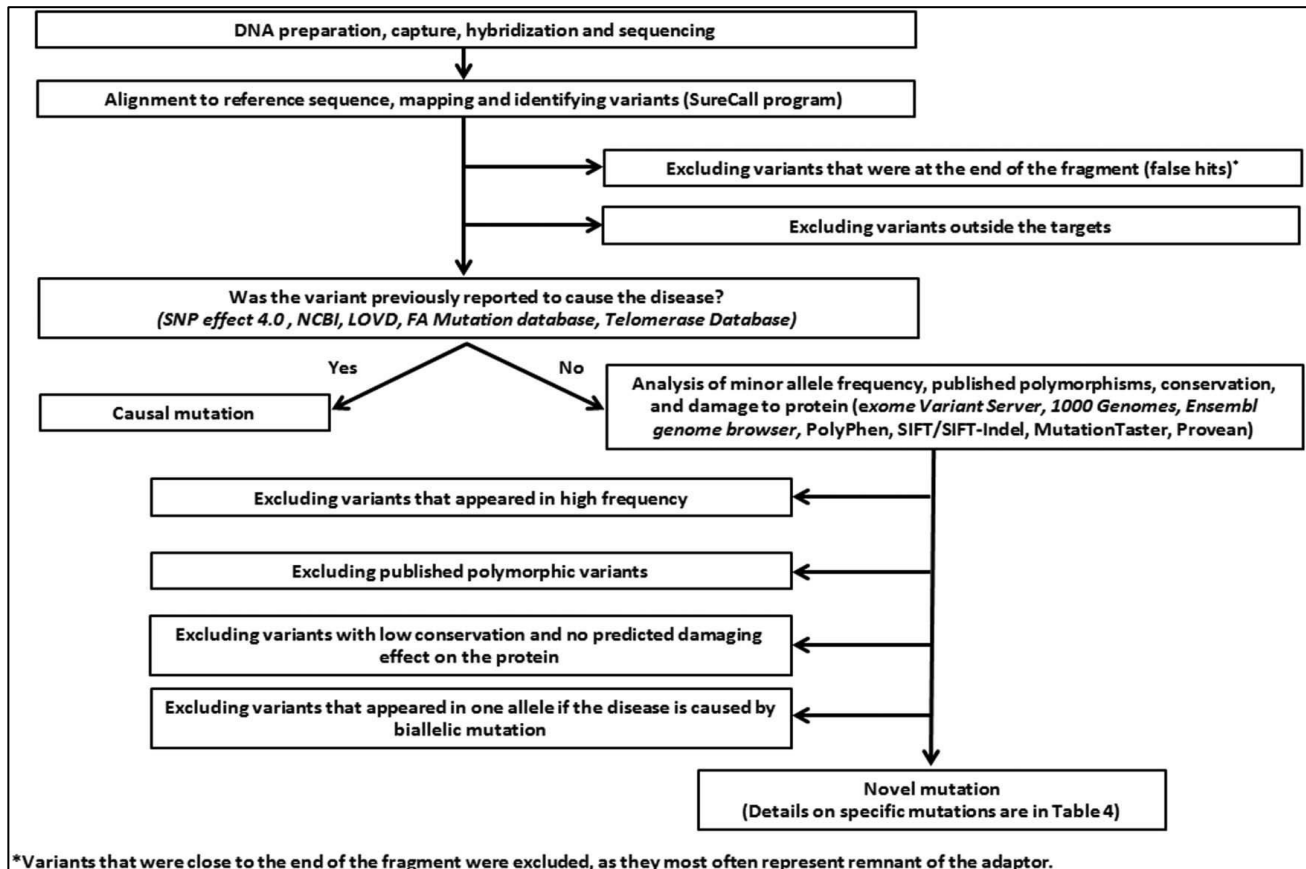


Figura 6.1: Pipeline de filtrado de variantes del grupo de Ghemlas, en el que se ha basado este trabajo. *Extraído de Ghemlas I, Li H, Zlateska B, et al. J Med Genet. 2015;52(9):575-584*

Sin embargo, aunque el análisis ha estado basado en el trabajo del grupo canadiense, el llevado a cabo por el grupo japonés de Muramatsu es muy similar. Inicialmente excluyen todas aquellas variantes reportadas como polimorfismos con una MAF <1%. En segundo lugar, consideran como mutación causal aquellas que hayan sido reportadas en la literatura como tal y aquellas con elevada sospecha de causar patología (variantes tipo *frameshift*, *nonsense* o en región de *splicing*). No consideran candidatas aquellas variantes de significado incierto sin ningún dato de patogenicidad.

Como puede observarse, las aproximaciones de los tres trabajos con respecto al filtrado de variantes son muy similares, sin embargo no es posible comparar la experiencia de la persona que lleva a cabo el análisis en ninguno de los casos, por lo que no se pueden comparar ni valorar las diferencias en este punto entre uno y otro grupo.

En cualquier caso, lo que sí parecen constatar estos resultados es que los paneles de genes específicos son una buena aproximación para la detección molecular en los SFMC y que esta herramienta es capaz de detectar mutaciones con alta sensibilidad y precisión. El panel NGS ayudó a establecer el diagnóstico en pacientes que no tenían demostración molecular hasta el momento y que solo habían sido diagnosticados mediante aproximaciones clínicas.

6.3 Capacidad diagnóstica según el fenotipo: fallo medular definido (FMD)

Hay que tener en cuenta que, además de esta serie, sólo el grupo canadiense categoriza a los pacientes en dos grandes grupos en función de su fenotipo y publican sus resultados en base a esa división. En nuestra serie, el ratio diagnóstico alcanzado en el grupo FMD fue del 53%. Si comparamos este dato con el del trabajo de Ghemlas podemos ver que ambas tasas son similares, ya que ellos alcanzan un 59% de detección molecular en el grupo compuesto por pacientes categorizados como FMD.

Como se ha comentado anteriormente, dentro de este grupo los pacientes han sido divididos en diferentes subcategorías. Si comparamos las tasas diagnósticas según el grupo de patología concreta, en nuestra serie el grupo con la mayor tasa de diagnóstico molecular fue el compuesto por pacientes con DC, FA y ABD, con una tasa diagnóstica del 66% (8/12), 65% (11/17) y 63% (12/19) respectivamente. A este grupo le siguen los pacientes estudiados por trombopenia con 53% (9/17) de diagnósticos. El grupo de neutropenia y SSD fueron en los que se obtuvo un rendimiento diagnóstico menor, con un 27% (3/11) y 16% (1/6) respectivamente.

En este caso, los datos pueden compararse tanto con los aportados por el grupo canadiense como por el japonés, ya que publican las tasas diagnósticas por patologías. De esta forma podemos ver que la distribución difiere de unos trabajos a otros.

Por una parte, en el trabajo de Ghemlas la patología con mayor tasa diagnóstica fue AF con un 75% (9/12) de detección molecular, seguido de ABD con el 70% (13/26), NGC 40% (4/10), DC 40% (2/5) y SSD 20% (1/5). Si analizamos los diagnósticos moleculares por grupos alcanzados en el trabajo de Muramatsu, podemos ver una distribución en el que la AF sigue siendo la patología con mayor tasa diagnóstica alcanzando un 68% (15/22), posteriormente es el SSD con un 67% (4/6) de detección molecular, ABD 46% (12/26), DC 38% (5/13), trombopenia 28% (4/14) y NCG 27% (2/7). Como se puede observar en el siguiente gráfico, los resultados varían en función de la patología.

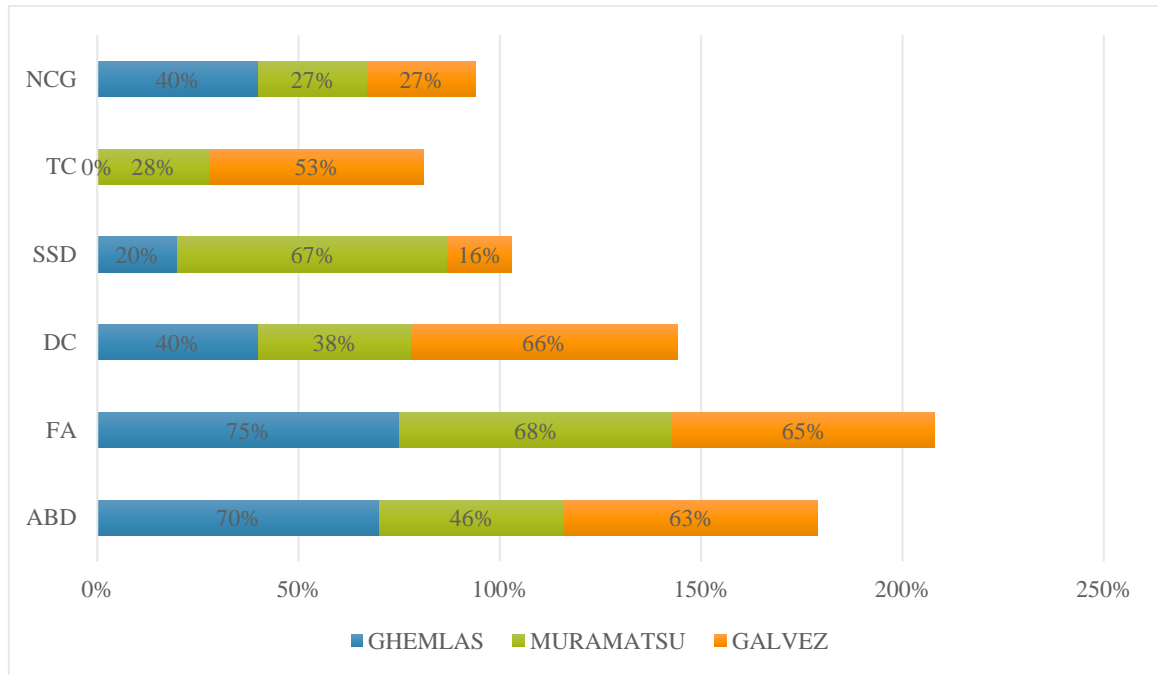


Gráfico 6.1: Comparativa con el trabajo de Ghemlas y Muramatsu

Si analizamos estos datos por patología, parece bastante evidente que el grupo de AF es el que presenta mejores tasas diagnósticas en los 3 grupos, encontrándose en todos los casos tasas diagnósticas superiores al 60%. En el resto de grupos los resultados son más heterogéneos, es por ejemplo el caso de ABD que en el trabajo de Muramatsu parece tener unos resultados más bajos o el de DC, donde nuestra serie es la que mayor tasa de diagnósticos tiene en esta patología con un ratio diagnóstico del 66%, estando los resultados de los otros grupos por debajo del 50%. En cualquier caso, estos datos no son comparables entre sí ya que existe gran variabilidad entre grupos, además de sesgos de selección.

6.4 Capacidad diagnóstica según el fenotipo: fallo medular indefinido (FMI)

Si analizamos los resultados según los grupos en los que se han dividido los pacientes, se puede observar una clara diferencia entre ambos, ya que el porcentaje de diagnósticos alcanzados en el grupo FMD fue del 50% frente al 23% de diagnósticos en el grupo FMI. El único trabajo que divide a los pacientes en estos dos grupos es el canadiense donde también se observa esta diferencia. En este trabajo la tasa de diagnóstico molecular fue del 59% en el caso de los fallos medulares definidos frente al grupo de fallo medular no clasificado, en el que fue del 18%. Esta diferencia nos puede dar a entender que en los casos de patologías clínicamente bien definidas como pueden ser ABD o AF, el porcentaje diagnóstico es más que aceptable, sin embargo en el caso de pacientes con fenotipos más complejos la aproximación diagnóstica mediante un panel de genes definido puede ser insuficiente. Estos datos son avalados por uno de los primeros trabajos publicados en este área, en el que el grupo de Zhang et al ¹⁰⁶ estudia mediante un panel NGS de 85 genes un total de 71 pacientes afectados de fallo medular sin características clínicas típicas de ningún SFMC clásico. En este trabajo se diagnostican molecularmente 8 de los 71 pacientes estudiados, alcanzando una tasa diagnóstica del 11%. Estos 8 pacientes presentaban variantes patogénicas en *GATA2*, *RUNX1*, *DKC1* y *LIG4*, pero no tenían las características fenotípicas típicas asociadas a estos genes. De esta forma podemos ver que el rendimiento de diagnóstico molecular en los SFMC indefinidos mediante un panel de genes concreto no supera el 20%, lo que hace pensar que este grupo podría beneficiarse de otras aproximaciones.

Es el caso de los datos aportados en el trabajo publicado por el grupo francés liderado por Soulier, en el que estudian un total de 179 muestras de pacientes con sospecha de SFMC ¹⁰⁷. En este grupo fueron estudiados pacientes con sospecha de SFMC sin fenotipo clínico definido, excluyéndose aquéllos con características de AF, ABD, DC, SSD y NCG. A todos ellos se les realizó WES de ADN extraído de fibroblastos, por lo que todas las muestras correspondían a línea germinal. Finalmente diagnosticaron un total de 86 pacientes, alcanzando una rentabilidad diagnóstica del 48%. Este dato es superior a los resultados obtenidos mediante paneles NGS, lo que parece indicar que WES es una herramienta a tener muy en cuenta en pacientes sin características clínicas definidas.

Además de la dificultad en el diagnóstico de los SFMC fenotípicamente atípicos, otras aproximaciones como WES se han utilizado cada vez más con el objetivo de identificar nuevos genes que arrojen luz sobre el conocimiento de la biología molecular subyacente a estos trastornos. Por ejemplo, utilizando la tecnología WES se logró identificar variantes patogénicas en *LIG4* como causa del síndrome de Dubowitz, un trastorno complejo asociado con anomalías congénitas, retraso del crecimiento y del desarrollo, defectos inmunes, fallo medular y cáncer ¹⁸⁸. Otro estudio identificó variantes patogénicas en el gen de la oncoproteína *EVI1* (*MECOM*) en tres individuos con sinostosis radiocubital asociada a trombocitopenia amegacariocítica. Previamente, sólo se habían asociado a esta rara enfermedad mutaciones en *HOXA11* ¹⁸⁹.

Así mismo, se identificaron como causa de fallo medular asociado a retraso del desarrollo variantes en *ERCC6L2* en homocigosis ¹⁹⁰. Este estudio fue el primero en vincular *ERCC6L2* con una supuesta alteración en la reparación del ADN y la función mitocondrial con esta enfermedad. De manera similar, el mismo grupo identificó la asociación de variantes patogénicas homocigotas en *DNAJC21* con el desarrollo de fallo medular, mostrando un nuevo vínculo entre este gen y la biogénesis de ARNr ⁷⁷.

Todos estos datos nos llevan a pensar que quizás una estrategia válida en aquellos casos fenotípicamente atípicos podría ser una primera aproximación a modo de *screening* mediante paneles NGS. De esta forma se podría diagnosticar ese 15-20% descrito en las series e identificar casos complejos que podrían beneficiarse de otras estrategias como WES.

En esta serie, aunque la tasa de diagnóstico en el grupo FMI sea inferior al FMD (24% vs 50%), la identificación de la alteración molecular también aporta ventajas importantes en pacientes sin clasificar. En concreto, han sido 7 los pacientes diagnosticados. La distribución de los genes detectados en este grupo de pacientes puede observarse en la gráfica siguiente:

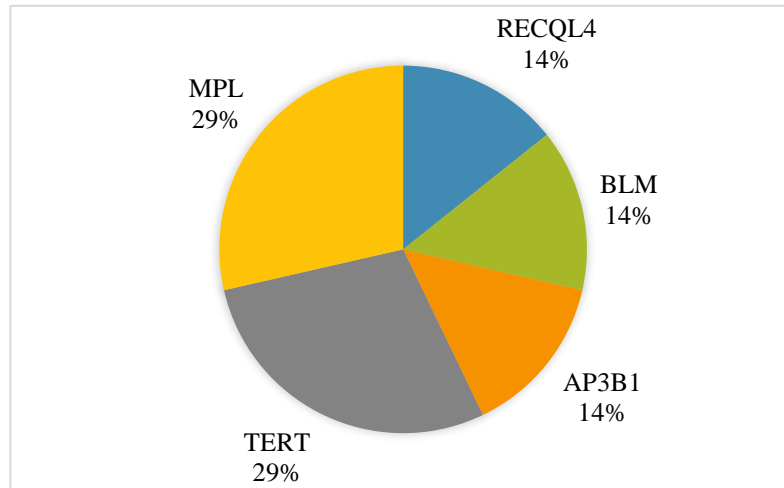


Gráfico 6.2: Distribución de genes detectados en el grupo FMI

Como se ha señalado, esta identificación ha implicado importantes ventajas en el manejo de estos pacientes. Por ejemplo, el paciente con mutación en *RECQL4*, tiene un elevado riesgo de padecer osteosarcoma^{191 183}, por lo que su seguimiento clínico podría implicar cambios importantes.

Es evidente que el número de pacientes es muy bajo, por lo que no podemos definir un gen ni una patología predominante. Sin embargo, conociendo estas limitaciones, habría que destacar que el gen *TERT*, además de estar presente en casi un tercio de este grupo de pacientes junto con *MPL*. Además, *TERT* es el más frecuentemente detectado en el trabajo de Ghemlas¹³⁸, en el que de los 15 pacientes con fallo medular de características indefinidas 4 de ellos presentaron mutación en *TERT*, siendo DC la patología más diagnosticada en casi la mitad de los pacientes de este grupo (7/15).

El caso de la familia con diagnóstico de DC por mutación en el gen *TERT* coincide con la literatura en que este gen es característico de formas de DC que se diagnostican en la edad adulta por tener unos fenotipos más leves^{192 45}. Sin embargo, el estudio de esta familia revelaba la presencia de un paciente con retinopatía exudativa diagnosticada en el primer año de vida y fallo medular de inicio en la adolescencia, por lo que no coincidía con lo descrito en otras series publicadas. Paralelamente, el fenotipo que presentaba el progenitor parecía muy distinto ya que no presentaba retinopatía ni fallo medular evidente, si no que había debutado como fibrosis pulmonar en la edad adulta y presentaba anemia de carácter leve. Esto lleva a pensar que parece haber una anticipación genética en la familia, con un empeoramiento del fenotipo evidente en el hijo en comparación con

su padre, es decir, aunque el padre tiene la misma mutación, su fenotipo parece ser más leve que el de su hijo, con una presentación mucho más tardía. La anticipación genética se ha descrito en otros casos de casos de DC de herencia AD, probablemente debido a la haploinsuficiencia de telomerasa y la disminución de la longitud del telómero a lo largo de generaciones sucesivas^{193 194}. La retinopatía exudativa se ha descrito en ciertos subtipos de DC^{195 196 197}, siendo el caso del denominado Síndrome de Revesz, que es una variante rara de DC asociada clásicamente a mutaciones en *TINF2* que se caracteriza por insuficiencia medular, retinopatía exudativa, retraso del crecimiento intrauterino, hipoplasia cerebelosa y deterioro cognitivo significativo^{198 199}. En el trabajo de Sharma y colaboradores, sugieren que determinados cambios en el gen *TERT* pueden asociarse a un subgrupo de pacientes con características clínicas similares al síndrome de Revesz pero sin el deterioro neurológico descrito en estas formas clínicas asociadas a mutaciones en *TINF2*²⁰⁰.

Estos datos nos confirman la idea de la gran heterogeneidad fenotípica que presentan los pacientes afectos de DC, pudiendo existir casos de forma más habitual de lo que se ha descrito hasta la fecha.

Por otra parte, como se ha comentado anteriormente, otro de los genes detectados en este grupo de pacientes con mayor frecuencia ha sido el gen *MPL*. Este gen se asocia al desarrollo de TAC, que se define como un síndrome que debuta con trombopenia grave en los primeros meses de vida y que puede evolucionar a aplasia medular⁹⁹. Sin embargo, también se han descrito fenotipos más leves o larvados asociados a determinadas mutaciones en este gen. En esta patología parece haber una relación genotipo-fenotipo entre el tipo de mutación y la gravedad de la enfermedad. Los pacientes con mutaciones tipo *frameshift* o *nosense* parecen tener una mayor progresión a insuficiencia medular, mientras que los pacientes con mutaciones tipo *missense*, tanto homocigotos como heterocigotos, pueden tener un desarrollo más lento de la enfermedad. Esto parece explicarse porque mutaciones tipo *nosense* o *frameshift* dan lugar a una pérdida completa del receptor de la trombopoyetina (rTPO), induciendo un fenotipo más grave de la enfermedad, mientras que pacientes con mutaciones tipo *missense* pueden tener un fenotipo más leve porque no hay una pérdida completa del receptor, si no que afectan a la funcionalidad del dominio extracelular del rTPO¹⁰¹. En este segundo supuesto podríamos incluir al paciente 23001, que presenta un fenotipo de aplasia medular y

característicamente es homocigoto para la mutación c.133T>C tipo *missense*. Es interesante destacar que hay un ratio de consanguinidad elevado entre progenitores de pacientes afectados de TAC, dando lugar a mutaciones homocigotas en el gen *MPL*²⁰¹. Los progenitores de este paciente son primos, por lo que este hecho coincide con lo descrito en la literatura.

En el trabajo de Ballmaier y colaboradores, en el que se define la primera serie de pacientes afectados de TAC con mutaciones patogénicas en el gen *MPL*, describen un solo caso de paciente doble heterocigoto y característicamente es el paciente con el fenotipo más leve de todos sin haber desarrollado pancitopenia⁹⁹. El paciente 10003 descrito en este trabajo presenta dos mutaciones diferentes en el gen *MPL* y como características clínicas presenta una trombopenia leve sin datos de pancitopenia, por lo que al igual que el paciente anterior podría encajar con el diagnóstico de TAC tipo 2. Siendo un doble heterocigoto, es importante determinar si las mutaciones están en *cis/trans* para confirmar que están en cromosomas distintos y por lo tanto, pueden dar lugar al fenotipo del paciente. Sin embargo, en este paciente no ha sido posible estudiar a los progenitores, por lo que no podemos tener la total seguridad de que este fenotipo sea debido a las mutaciones heterocigotas detectadas.

6.5 Análisis de las patologías con mayor tasa diagnóstica: Anemia de Blackfan Diamond, Anemia de Fanconi y Disqueratosis Congénita

6.5.1 Anemia de Blackfan Diamond

Si analizamos por tipo de patología podemos ver que el grupo compuesto por aquellos pacientes estudiados por eritroblastopenia congénita fue uno en los que se obtuvo uno de los mejores rendimientos diagnósticos con una tasa del 63% de pacientes con detección molecular. Ha habido otros grupos que han realizado aproximaciones parecidas con el objetivo de ver en cuantos pacientes se podría identificar la alteración molecular y entre ellas cual era el gen mayormente mutado en estos casos. En la tabla 6.1 se resumen los principales trabajos publicados relacionados con el estudio molecular en pacientes con ABD.

GRUPO	PACIENTES ESTUDIADOS	PACIENTES DIAGNOSTICADOS	PLATAFORMA	GENES ESTUDIADOS
Arbiv et al. ²⁰²	61	35 (74%)	NGS	<i>RPL11, RPL35A, RPL5, RPS10, RPS17, RPS19, RPS24, RPS26, RPS29, RPS7</i> Total: 10
Gálvez et al. (pte publicación)	19	12 (63%)	NGS	<i>RPS19, RPS24, RPS17, RPL35A, RPL5, RPL11, RPS7, RPS10, RPS26, RPL26, RPL15, RPS29, RPL31, GATA1, RPL19, RPL27, RPS27, RPS28, TSR2</i> Total: 19
Smetanina et al. ²⁰³	57	35 (61%)	Secuenciación Sanger	<i>RPS7, RPS10, RPS17, RPS19, RPS24, RPS26, RPL5, RPL11, RPL35A, GATA1</i> Total: 10
Van Dooijeweert ²⁰⁴	43	26 (60%)	Secuenciación Sanger	<i>RPS7, RPS10, RPS17, RPS19, RPS24, RPS26, RPL5, RPL11, RPL35A</i> Total: 9
Wan et al. ²⁰⁵	48	28 (58%)	NGS	<i>RPS19, RPS24, RPS17, RPL35A, RPL5, RPL11, RPS7, RPS10, RPS26, RPL26, GATA1</i> Total: 11
Quarello et al. ²⁰⁶	92	45 (49%)	Secuenciación Sanger	<i>RPS24, RPL5, RPL11, RPL35A, RPS14, RPS16, RPS19</i> Total: 7
Ghemlas et al. ¹³⁸	23	16 (70%)	NGS	<i>RPL11, RPL27, RPL35A, RPL5, RPS10, RPS19, RPS24, RPS27, RPS26, RPS29, RPS7</i> Total: 11
Muramatsu et al. ¹⁴¹	12	26 (46%)	NGS	<i>GATA1, RPL11, RPL26, RPL31, RPL35A, RPL5, RPS10, RPS14, RPS17, RPS19, RPS24, RPS26, RPS29, RPS7</i> Total: 14
Delaporta et al. ²⁰⁷	17	6 (35%)	Secuenciación Sanger	<i>RPS19, RPL5, RPL11</i> Total: 3

Tabla 6.1: Principales trabajos publicados relacionados con el estudio molecular en pacientes con ABD.

Como se puede observar, la tasa de detección molecular entre los diferentes grupos de trabajo varía entre el 74% del trabajo de Arbiv²⁰⁸ al 35% del grupo de Delaporta²⁰⁹ (gráfico 6.3). La diferencia de detección entre grupos podría residir en el número de genes y la capacidad de detección de la técnica empleada. Sin embargo, podemos ver que grupos con resultados similares han secuenciado un número de genes variable e incluso mediante técnicas distintas. Es el caso por ejemplo del grupo de Quarello²¹⁰ y Muramatsu¹⁴¹. En el primero se secuencian mediante Sanger un total de 7 genes y en el segundo se incluyen 14 genes en un panel NGS y, sin embargo, tienen tasas de detección molecular similares, en concreto de 49% y 46% respectivamente. Por tanto, no parece que la técnica empleada ni el número de genes sea determinante a la hora de diagnosticar este tipo de pacientes, más bien la diferencia podría residir en el tipo de pacientes estudiados y los criterios de selección establecidos para el estudio.

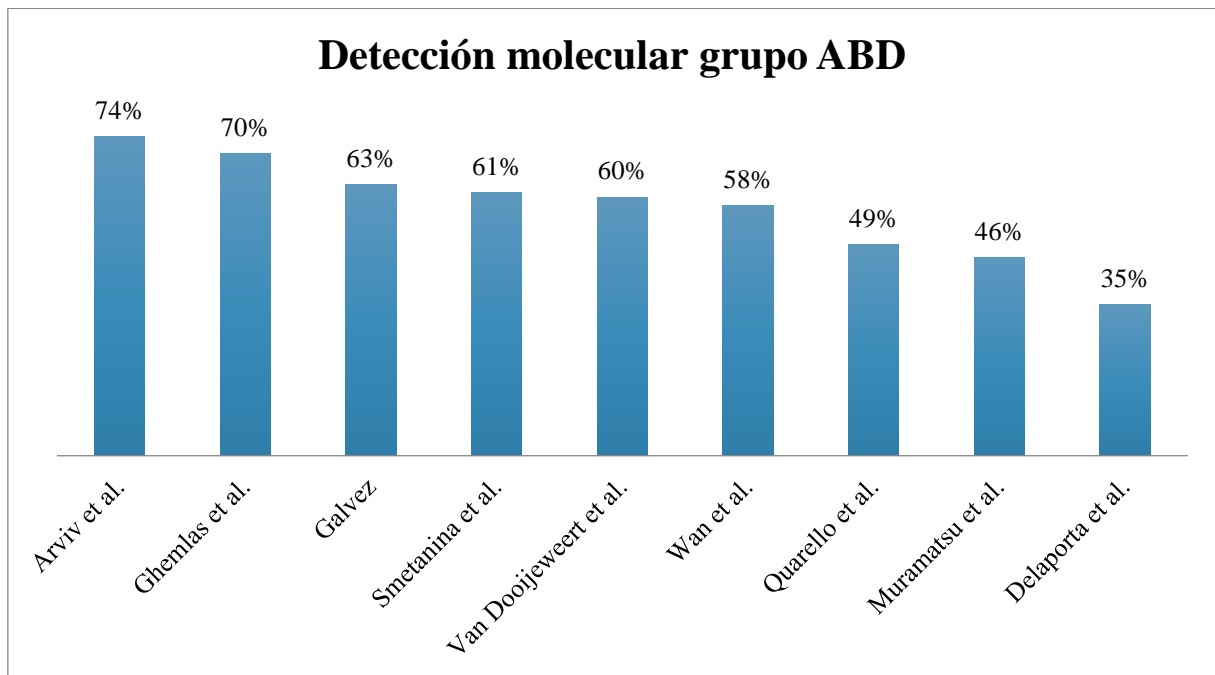


Gráfico 6.3: Gráfico comparativo de la detección molecular según el grupo.

Por otra parte, hay que comentar la gran variabilidad genética que caracteriza a esta patología. Como ya se ha descrito en la literatura, es bien sabido que el gen más comúnmente mutado es *RPS19*, correspondiendo al 25% de los casos de ABD¹⁶ seguido de *RPS26*, con una tasa del 10% aproximadamente¹⁵⁷. Sin embargo, ha sido descrito que la frecuencia de mutaciones en *RPS19* varía entre diferentes grupos étnicos, siendo del 11% en la cohorte japonesa de Konno et al²¹¹. Por tanto, podría haber variabilidad de frecuencias entre distintos grupos de trabajo.

Sin embargo, en el análisis extraído de distintas series, *RPS19* es el gen más frecuente (gráfico 6.4) a excepción de los datos del grupo de Ghemlas y los de este trabajo, en que la frecuencia de mutaciones detectadas en *RPS19* son del 18% (3/16) y 8% (1/12) respectivamente.

En el caso de este trabajo, además de las diferencias que pueden existir entre distintas etnias, este hallazgo se explica por el hecho de que muchos de los pacientes incluidos en este grupo eran pacientes de largo seguimiento en los que ya se había realizado cribado previo de *RPS19* en su centro de origen. Por tanto, una gran parte de los pacientes de este grupo eran negativos para *RPS19*, lo que ayuda a explicar la baja tasa de mutaciones en este gen.

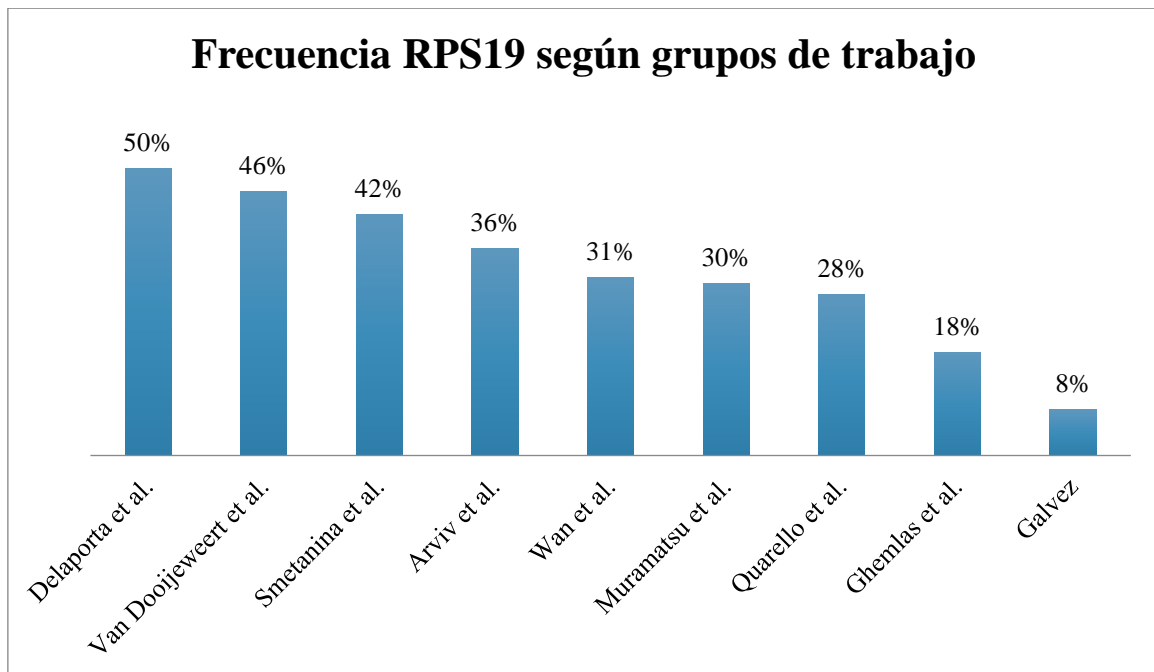


Gráfico 6.4: Frecuencia del gen *RPS19* según los diferentes grupos de trabajo

Si analizamos los genes más frecuentemente mutados en los grupos de trabajo anteriormente descritos, se puede observar que aunque haya variabilidad genética y la frecuencia de las mutaciones se reparta entre diferentes genes, parece ser que este reparto se concentra en unos pocos. Tal y como se puede observar en la tabla 6.2, las casillas coloreadas de naranja son aquellos genes con mayor frecuencia en cada uno de los grupos y como ya se ha comentado, claramente destaca la presencia de *RPS19*. Sin embargo, a pesar de que la mayoría de los grupos han secuenciado una media de 10 genes, gran parte de las mutaciones han sido detectadas en los genes *RPS26*, *RPL5* y *RPL11*. Esta podría ser la explicación de que no parece que el número de genes estudiados aumente la tasa de detección, ya que los genes más frecuentemente mutados están analizados en todos los grupos.

	RPS19	RPL5	RPS7	RPS10	RPS26	RPL11	RPS24	RPL35A
Arbiv et al.	36%	16%	-	3	11%	16%	3%	3%
Gálvez	8%	16%	16%	-	25%	16%	4%	-
Smetanina et al	42%	17%	8%	8%	8%	8%	3%	3%
Van Dooijeweert	46%	5%	-	-	19%	8%	-	-
Wan et al	53%	10%	3%	-	14%	7%	7%	3%
Quarello et al	28%	10%	-	-	-	10%	2%	-
Ghemlas et al.	19%	-	6%	-	31%	19%	8%	6%
Muramatsu et al.	33%	16%	-	-	-	-	8%	-

Tabla 6.2: Genes más frecuentemente mutados en los diferentes grupos de trabajo

6.5.2 Anemia de Fanconi

A diferencia de ABD, en el caso de los pacientes diagnosticados de AF, la variabilidad genética detectada ha sido mínima, ya que de los 11 pacientes diagnosticados 9 pertenecían al grupo de *FANCA* (80%) y los otros dos *FANCG* (20%).

Estos datos son comparables a los descritos en la literatura, en concreto, el trabajo de De Rocco et al¹⁸⁵ es uno de los más representativo. Estudian un total de 100 pacientes con sospecha de AF mediante secuenciación masiva. En este trabajo, las frecuencias de los genes detectados se pueden ver en el siguiente gráfico:

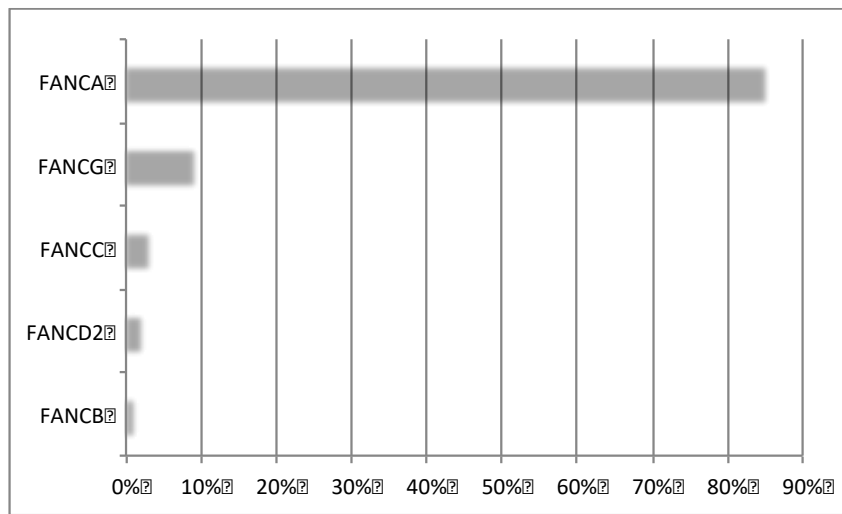


Gráfico 6.5: Frecuencias de los genes detectados en el grupo de De Rocco

Si comparamos estos resultados con los de la base de datos de mutaciones en genes Fanconi (<http://www.rockefeller.edu/fanconi/>)²¹², el gen *FANCA* representa el 63%. Sin embargo, en nuestra serie al igual que en el grupo italiano de De Rocco¹⁸⁵ y publicaciones previas como la de Castella et al²¹³ que está centrada en la población española, las mutaciones en *FANCA* suponen entre el 80-85% de los pacientes, seguido en frecuencia por *FANCG*. Esto sugiere que en la cuenca mediterránea mutaciones en otros genes son extremadamente raras¹⁸⁵.

Por este motivo podría pensarse que siendo *FANCA* el gen mayormente mutado en nuestro medio, la aproximación diagnóstica clásica en este tipo de pacientes podría ser una opción a tener en cuenta. En concreto, en el trabajo publicado por el grupo español de AF²¹⁴, previa al desarrollo de las técnicas de nueva generación, se sugería una

estrategia para el subtipaje de pacientes Fanconi basado en estudios de complementación, tal y como se observa en la figura 6.2.

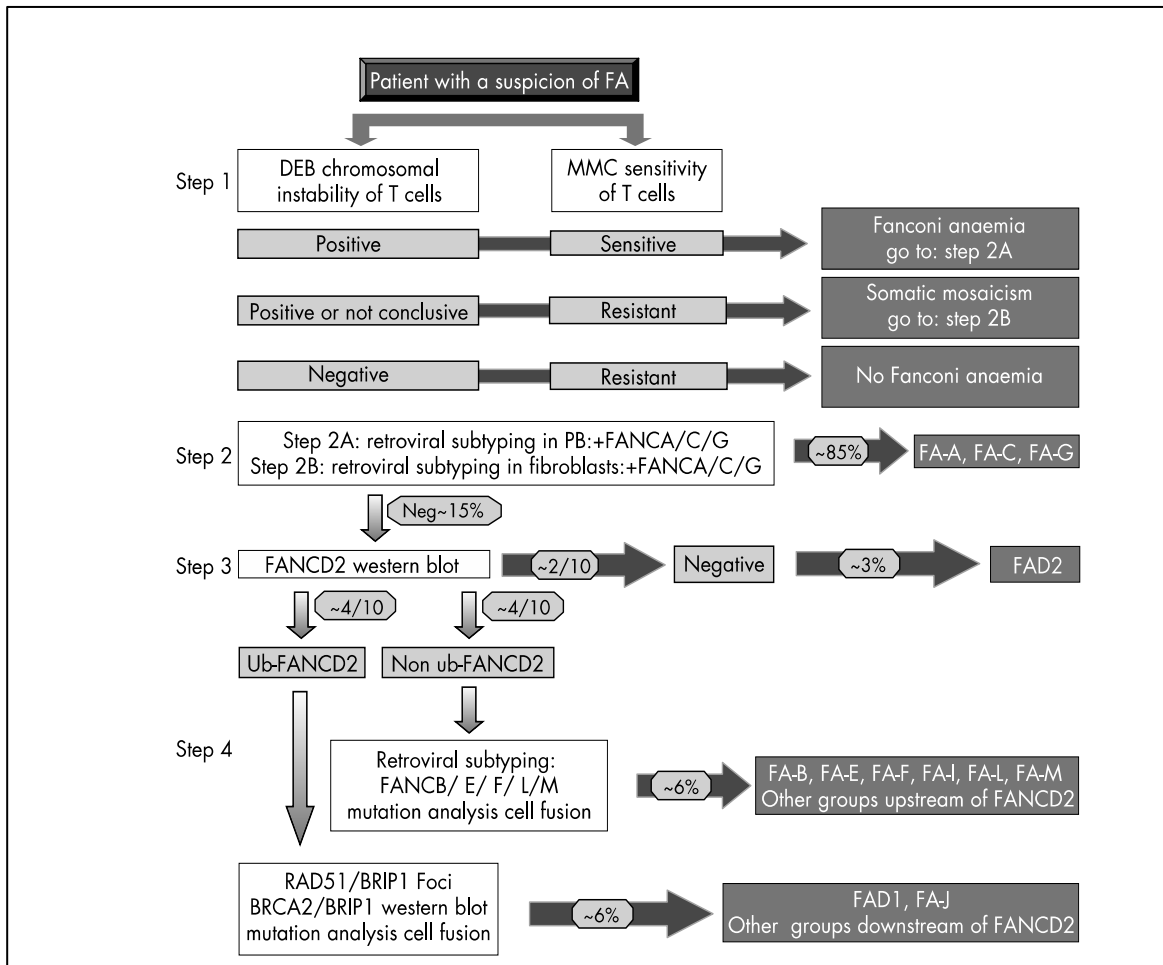


Figura 6.2: Algoritmo de subtipificación de pacientes con AF mediante estudios de complementación. *Extraído de Casado JA, Callén E, Jacome A, et al. J Med Genet. 2007;44(4):241-249.*

En este algoritmo se propone un proceso de cuatro pasos para la subtipificación de pacientes con anemia de Fanconi. El paso 1 tiene como objetivo confirmar el diagnóstico de anemia de Fanconi y mosaicismo somático mediante el test de fragilidad cromosómica con MMC y DEB. De acuerdo con el paso 2, aproximadamente el 85% de los pacientes con anemia de Fanconi serían subtipificados por complementación retroviral, ya que pertenecerían a los grupos A, C o G mayoritariamente. Los grupos de complementación del 15% restante de los pacientes podrían ser discriminados por medio de análisis mostrados en el paso 3. Finalmente, el subtipo de grupos de complementación

menos frecuentes o el descubrimiento de otros nuevos podrían determinarse por medio de diferentes enfoques de investigación descritos en el paso 4.²¹⁴.

Como puede observarse, se trata de un procedimiento muy laborioso que requiere de tiempo y elevados costes, ya que utiliza fusiones celulares y vectores retrovirales que requieren servicios de laboratorio especializados, además de un equipo altamente cualificado para poder llevarlo a cabo. Además de esta, hay otras razones por las que anteponer los estudios genéticos mediante NGS a los de complementación. Por un lado, los estudios mediante NGS permiten la detección de portadores en los progenitores y familiares directos, para de esta forma poder tomar decisiones de planificación familiar. Además, también puede ser útil en ese porcentaje de pacientes que tienen mosaicismo somático o que experimentan reversión hematopoyética, donde el análisis de fragilidad cromosómica puede ser dudoso e incluso negativo^{114 215}

Como se ha comentado, la gran mayoría de los pacientes con AF, en torno al 95%, tendrán una mutación en *FANCA*, *FANCC*, *FANCE*, *FANCF* y *FANCG*¹⁰⁶. Con aproximaciones de secuenciación masiva como un panel de genes o WES, estos genes pueden ser analizados de forma simultánea, además de ofrecer la ventaja de secuenciar el gen completo. Esto es especialmente útil en *FANCA* que siendo el gen mayoritariamente afectado en esta población, es un gen de gran tamaño con 43 exones, por lo que la secuenciación Sanger es más compleja que en genes de menor tamaño.

En caso de que la estrategia fuera secuenciar los 5 genes más frecuentes mediante técnicas convencionales, el coste probablemente sería mayor que secuenciarlo mediante NGS, además de que el análisis conllevaría más tiempo y gasto de recursos. Por otra parte, la aproximación mediante NGS nos ofrece la ventaja adicional de encontrar variantes poco frecuentes en el grupo de genes restantes asociados a AF.

AF es uno de los pocos SFMC con una prueba de *screening* específica, por lo que el porcentaje de diagnósticos utilizando plataformas NGS debería ser muy elevado. Sin embargo, en esta serie la rentabilidad diagnóstica en esta patología ha sido del 65%, que aun siendo similar a la de otros grupos, es inferior a lo esperado.

Esto podría explicarse por el sesgo de selección de pacientes, ya que en este trabajo no se ha exigido ninguna prueba complementaria previa a la realización del

estudio, si no que se incluyeron a criterio del médico responsable. En este sentido, si se analizan los datos de los pacientes en los que se disponía del TFC, que fueron un total de 12, se diagnosticaron 11 de ellos. Obteniéndose así una tasa diagnóstica del 91% de los pacientes con TFC positivo.

El único caso de paciente con TFC positivo sin detección de ninguna mutación puntual en el estudio NGS, fue aquel que presentaba una delección en el gen *FANCA*. En este caso, fue determinante la alta sospecha clínica de AF y la positividad del TFC. Este hecho dio lugar al estudio de CNV mediante NGS y finalmente al diagnóstico de una gran delección confirmada por MLPA, ya comentada en el apartado de resultados. Es bien sabido que una de las grandes limitaciones de las técnicas NGS es precisamente la identificación de grandes deleciones e inserciones. En el caso de AF, el porcentaje de pacientes portadores de deleciones de gran tamaño oscila en torno al 15%, por lo que el diagnóstico molecular sólo se alcanzaría mediante técnicas convencionales. Sin embargo, esto no es del todo cierto ya que hay trabajos que hablan de la posibilidad de identificar grandes deleciones mediante plataformas NGS tanto en AF como en otras patologías ²¹⁶ ¹⁸⁶. En concreto, en el trabajo de Nicchia et al. ²¹⁷ se analizan un total de 30 muestras de pacientes diagnosticados de AF mediante NGS. Entre ellos se incluyeron 4 con deleciones conocidas en el gen *FANCA*, confirmándose la presencia de todas ellas mediante el análisis de CNV. Además, en el caso de dos pacientes sin alteración molecular detectada, esta aproximación fue capaz de caracterizar deleciones de gran tamaño en ambos casos. Por tanto, este grupo concluye que las plataformas NGS pueden ser una buena aproximación tanto para el diagnóstico de pacientes con mutaciones puntuales como aquellos afectos por deleciones de gran tamaño.

6.5.3 Disqueratosis Congénita

La DC es otro de los SFMC que dispone de una prueba de *screening* específica, en concreto la medición de la LT. Una LT en linfocitos de sangre periférica por debajo del primer percentil para la edad acompañado de características clínicas compatibles con una telomeropatía, puede identificar con precisión a pacientes con mutaciones en genes asociados a DC^{192 63 218}. Además, la LT acortada influye en la gravedad e inicio de los síntomas de la enfermedad, ya que el fenotipo dependerá de este dato²¹⁹. De esta forma, se puede decir que una mutación específica no está relacionada directamente con el fenotipo, si no con la longitud telomérica. Es decir, se conoce que los telómeros con mayor acortamiento son los determinantes a la hora de inducir la senescencia celular, por tanto a mayor acortamiento, mayor patología^{220 221 222}. Un ejemplo que evidencia este hecho es el caso de *TINF2*, ya que los pacientes que presentan mutaciones en este gen tienen los telómeros más cortos descritos en humanos hasta la fecha y, en general, presentan los fenotipos más patológicos con manifestaciones en los primeros años de vida^{198 223}.

En este trabajo, a diferencia del grupo de AF, todos los pacientes con sospecha de DC tenían realizado el estudio de LT. En todos los casos el resultado era inferior al percentil 10 para su edad, por lo que cabría pensar que dado lo comentado anteriormente, podrían ser pacientes sin criterios de telomeropatía, ya que en algunos casos la LT se situaba por encima del p10. Sin embargo, también ha sido descrito en la literatura que la sensibilidad y especificidad de esta técnica en pacientes que carecen de estas características típicas están menos establecidas. En el trabajo de Yamaguchi y colaboradores, describen 7 pacientes adultos con AA en los que se detectó mutación en el gen *TERT* y tan sólo 1 de ellos tenía una LT por debajo del primer percentil, estando la mayoría entre el percentil 1 y 10⁴⁵. Una idea similar refleja el grupo de Vulliamy, que estudian un total de 194 pacientes con mutaciones en *DKC1*, *TINF2*, *TERT* y *TERC*. En este trabajo se observan grandes diferencias en los estudios de longitud telomérica, siendo completamente normal en algunos casos que incluso se acompañaban de características clínicas típicas²²⁴. Por tanto, parece razonable establecer el percentil 10 como límite de detección para identificar posibles telomeropatías.

Por otra parte, es importante destacar que una medición telomérica acortada no es

exclusiva de pacientes con DC, ya que también puede ser un marcador que refleje una baja reserva de células hematopoyéticas en la médula ósea o una exposición del ADN al daño oxidativo²²⁵. Por estos motivos, pueden observarse telómeros cortos en otros SFMC como AF, ABD o SSD^{170 226 227 228}. Por tanto, puede haber pacientes afectados de DC con una longitud telomérica por encima del primer percentil y pacientes con acortamiento telomérico afectados de otras patologías, por lo que los resultados de esta prueba de *screening* deben ser realizados e interpretados por personal experto.

Teniendo en cuenta estas premisas, es razonable pensar que una LT acertada no es sinónimo de DC, aunque sí muy sugerente. Por tanto, una posible aproximación para el estudio de estos pacientes es la que sugiere el trabajo de Townsley que puede resumirse en la figura 6.3¹⁹².

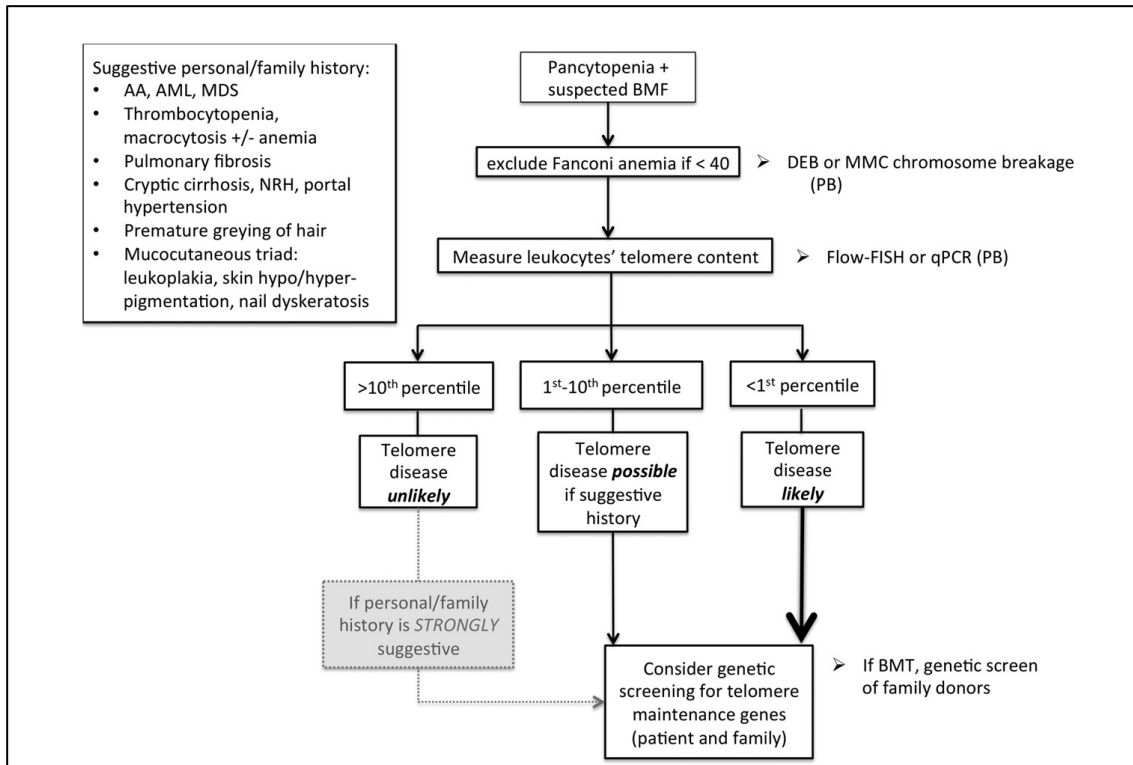


Figura 6.3: Algoritmo para el diagnóstico de pacientes con sospecha de SFMC. *Extraído de Townsley DM, Dumitriu B, Young NS. Blood. 2014 Oct 30;124(18):2775-83*

Antes de las técnicas NGS, la causa genética de la DC se conocía en menos de la mitad de los pacientes¹¹². Sin embargo, en la actualidad se estima que la causa genética se conoce ahora en aproximadamente el 70% de las familias con DC, lo que se atribuye

al reciente descubrimiento de genes asociados a DC, fundamentalmente *CTCI* y *RTELI*⁶¹⁶². En nuestra serie, el porcentaje de diagnóstico molecular está en el 66%, acercándose mucho a este dato publicado, pero difiere claramente con los resultados de los grupos de Ghemlas y Muramatsu, en los que el ratio diagnóstico de esta patología se encuentra en el 40% y 38%, respectivamente. No obstante, estos resultados también evidencian la presencia de pacientes con acortamiento telomérico patológico sin demostración molecular. Esta es una de las grandes diferencias respecto al grupo AF, en el que los pacientes en los que no se ha detectado alteración molecular tienen un TFC negativo o su interpretación es dudosa. Es difícil saber si la tasa diagnóstica mediante este panel NGS se encuentra dentro de lo esperable, ya que la mayoría de estudios NGS realizados en DC son tipo WES, orientados al descubrimiento de nuevos genes. Es el caso de varios grupos que han identificado de forma independiente mutaciones *RTELI* utilizando WES en familias con DC^{52 55 54}.

En la DC, el primer gen descubierto fue *DKCI*, siendo el más comúnmente mutado en esta patología según la serie, aunque el dato exacto se desconoce. Se estima que los genes más frecuentemente mutados son *DKCI* (25-20%), *TINF2* (11-20%), *TERT* (5%), *TERC* (5%) y *RTELI* (5-10%)^{224 10}. En este trabajo, coincidiendo con lo descrito en la literatura, *DKCI* ha sido uno de los genes más frecuentemente mutados, detectándose en 3 de los 12 pacientes incluidos en este grupo (25%). *RTELI* también se detectó en 3 pacientes (25%) y *TERT* en 2 (8%). Como puede observarse, todos los genes detectados en estos pacientes se encuentran dentro del grupo de los genes mayormente mutados en esta patología. En esta serie no se han detectado mutaciones en genes como *ACD*, *POT1*, *PARN*, *NAFI* o *STN1*, asociados a defectos teloméricos detectados mediante WES en trabajos recientemente publicados, siendo la frecuencia real de todos estos genes aún desconocida⁵⁶.

6.6 Análisis de las patologías con menor tasa diagnóstica: Síndrome de Shwachman Diamond y Neutropenia Congénita Grave

6.6.1 Síndrome Shwachman-Diamond

Como puede observarse en los datos anteriores, el grupo de pacientes con neutropenia, tanto aquellos que tenían fenotipo de SSD como NCG destaca por la baja tasa de diagnóstico molecular en este trabajo. En el caso de los pacientes con sospecha de SSD, en el que de los 6 pacientes estudiados sólo se ha detectado mutación en uno de ellos, esta tasa es mucho más baja que la reportada por el grupo de Muramatsu donde se diagnosticaron 4 de los 6 pacientes estudiados por sospecha de SSD. En este caso concreto, la diferencia podría residir en los estudios genéticos previos realizados a estos pacientes antes de ser incluidos en el estudio. Es de destacar que a fecha de 2015, cuando se diseñó este panel NGS, tan solo el gen *SBDS* se había asociado al desarrollo de esta patología, por lo que de los 5 pacientes sin diagnóstico molecular 3 de ellos eran negativos para este gen. A lo largo del desarrollo de este proyecto se han descrito nuevos genes asociados a esta patología, en concreto *DNAJC21*^{77 78} y *EFLI*⁷⁹. En uno de los pacientes en los que no se halló resultado, posteriormente se realizó WES, detectándose mutado el gen *DNAJC21*.

Este hecho parece indicar que en este tipo de pacientes con un cuadro clínico tan específico de esta patología, es necesario continuar su estudio mediante otras aproximaciones con el fin de llegar a un diagnóstico molecular definitivo. Por tanto, podríamos decir que aquellos pacientes muy sugestivos de SSD negativos para el gen *SBDS*, podrían no beneficiarse de aproximaciones mediante paneles NGS que no estén actualizados.

Además el gen *SBDS* comparte más del 95% de su homología con su pseudogen *SBDSP*¹⁷. Las mutaciones patogénicas en estos pacientes surgen de la conversión génica por la combinación entre el gen *SBDS* y su pseudogen⁷⁶. Por este motivo, si se utilizan técnicas de secuenciación que generan fragmentos cortos, es muy difícil analizar zonas homólogas del genoma como los pseudogenes, ya que durante el alineamiento de estas

secuencias se pueden producir mapeados ambiguos y pueden no asignarse a una posición concreta.

Sin embargo, este hecho ha sido posible solventarlo realizando un análisis del gen mediante IGV. Siguiendo la recomendación publicada por el grupo de Ghemlas, se ha localizado una región del gen *SBDS* cercana a las mutaciones habituales que lo diferencia del pseudogen. En concreto, se trata de la secuencia CTTTTTGG que pertenece al gen *SBDS* (imagen 6.2). En caso de que hubiera contaminación por el pseudogen, habría un cambio en esta secuencia en la T central, quedando CTTCTTG.

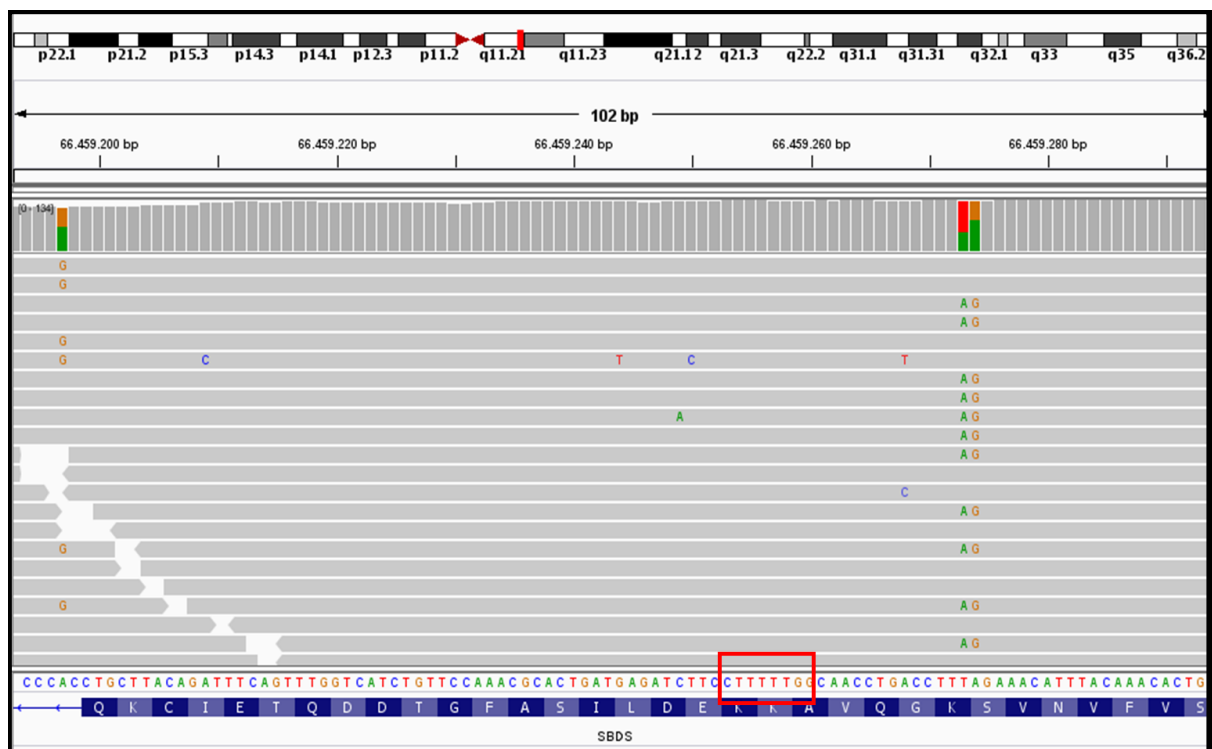


Imagen 6.2: Imagen de la secuencia CTTTTTGG del gen *SBDS*.

En la imagen 6.3 se puede observar un paciente con la mutación 258+2T>C en heterocigosis y al ver la otra mutación 183_184TA>CT, se puede observar que comparte haplotipo con la secuencia CTTCTTG, por lo que la mutación 183_184TA>CT correspondería al pseudogen y la la mutación 258+2T>C al gen *SBDS*. De esta forma el paciente solo presenta una mutación real en el gen *SBDS*.

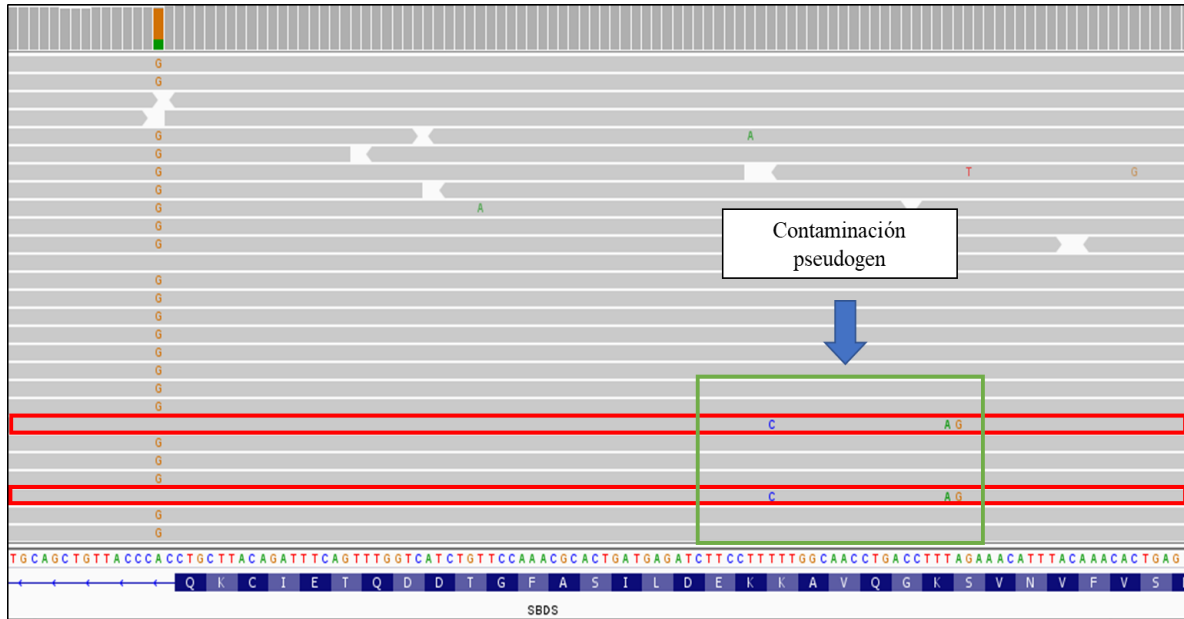


Imagen 6.3: En esta imagen se puede observar que la mutación 183_184TA>CT comparte el mismo haplotipo que la secuencia CTTCTTG y no lo comparte con la mutación 258+2T>C. Por tanto, la mutación 183_184TA>CT es el resultado de una conversión génica por la combinación entre el gen *SBDS* y su pseudogen.

En la imagen 6.4, se puede observar un caso de SSD con ambas mutaciones en haplotipos diferentes pero sin contaminación del pseudogen, ya que no se observa el cambio T>C, si no la secuencia CTTTTTG correspondiente al gen *SBDS*.

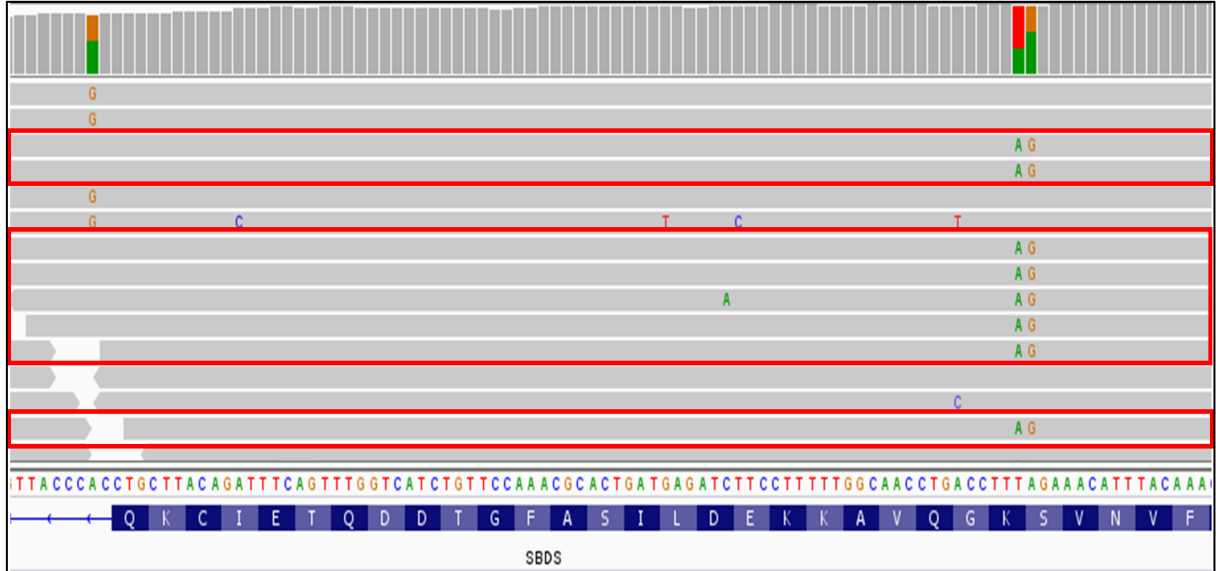


Imagen 6.4: En esta imagen se han marcado con líneas rojas las lecturas correspondientes a la mutación 183_184TA>CT y, como puede observarse no comparte el mismo haplotipo que la mutación 258+2T>C ni parece existir contaminación por el pseudogen ya que la secuencia CTTTTTG se encuentra conservada. Por tanto, ambas mutaciones se encuentran en el gen *SBDS*.

6.6.2 Neutropenia Congénita Grave

El siguiente grupo con baja tasa de detección es el compuesto por aquellos pacientes con sospecha de NCG, que ha sido del 27%. Actualmente, se estima que tras la aparición de las nuevas técnicas NGS, alrededor de un 40% de los pacientes continúan sin diagnóstico molecular¹⁰³. Sin embargo, este dato está basado en datos no publicados, ya que no hay series específicas de pacientes con NCG estudiados mediante paneles de genes. Para poder comparar estos resultados, tenemos que volver a los trabajos de Ghemlas¹³⁸ y Muramatsu¹⁴¹, que han alcanzado unas tasas diagnósticas del 40% y 27% respectivamente. Por tanto, aunque nuestros resultados resulten bajos, no difieren mucho de los grupos que han realizado aproximaciones similares.

Hay que destacar que la neutropenia en la población general es relativamente frecuente, se estima que alrededor del 1% de la población puede tener neutropenia en mayor o menor grado²³⁰, sin embargo, los casos de neutropenia congénita son extremadamente raros observándose en menos de 1/100.000 personas^{102 103}. Por tanto, es lógico pensar que en este trabajo habrá un porcentaje no desdeñable de pacientes en los que el origen de la neutropenia no sea congénito. Es decir, no debe pensarse que el hecho de que esos pacientes sean negativos implique que haya que investigar otras posibles causas moleculares, si no que habría que reevaluar si realmente cumplen criterios clínicos de NCG. Esta podría ser la explicación de que el grupo de Ghemlas¹³⁸ detecte un porcentaje mayor de casos congénitos, ya que la selección de pacientes ha sido mucho más exhaustiva y específica.

Dentro de este grupo, además de los pacientes afectados por *ELANE* y *JAGN1*, genes asociados con NCG^{231 176}, se ha detectado un paciente con mutación tipo VOUS en *TCIRG1*. Mutaciones en homocigosis en *TCIRG1* son la causa más frecuente de Osteopetrosis autosómica recesiva, con una frecuencia estimada en la población de 1/250.000²³². Sin embargo, recientemente se han asociado a NCG mutaciones en heterocigosis en este gen. En concreto, el primer trabajo que ha descrito este hecho es el publicado por Makaryan et al en 2014²³³, en el que estudian una familia con neutropenia asociada a la mutación c.2206C>A que produce un cambio de Arginina por Serina. Esta alteración resulta en un cambio importante respecto al tamaño y propiedades moleculares de los aminoácidos, que además se encuentra en una región altamente conservada.

Los productos de *TCIRG1* se expresan ampliamente en células hematopoyéticas, además el perfil de expresión de ARN de precursores granulocíticos de donantes sanos sugiere que *TCIRG1* está altamente expresado en promielocitos²³⁴. Por lo tanto, *TCIRG1* p.Arg736Ser también puede actuar directamente sobre precursores granulocíticos influyendo en su diferenciación o maduración. En el trabajo de Makaryan²³³ teorizan que es posible que *TCIRG1* p.Arg736Ser pueda alterar indirectamente la granulopoyesis al alterar el microambiente de la médula ósea, explicando así la neutropenia.

En el caso de nuestro paciente, la mutación se halla en el mismo lugar (c.2206C>T), solo que el cambio es de Arginina a Cisteína. Esta mutación está considerada según la ACMG como VOUS. Sin embargo, el cambio afecta al mismo aminoácido introduciendo una Cisteína, que comparte similitudes con el aminoácido Serina, por lo que la teoría anteriormente expuesta podría aplicarse a este caso, explicándose de esta forma la neutropenia presente en este paciente.

6.7 Análisis del grupo de trombopenia congénita

En este grupo de TC, históricamente los estudios moleculares se han centrado en las formas recesivas del Síndrome de Bernard-Soulier (SBS), causadas por variantes en *GP1BA*, *GP1BB* o *GP9*, que generalmente asocian tendencia importante al sangrado. Sin embargo, en el trabajo de Noris y cols. En el que analizan el tamaño plaquetario de más de 300 pacientes con patología plaquetaria conocida, el grupo de SBS sólo representa aproximadamente el 5% de las trombopenias hereditarias²³⁵. Más recientemente y coincidiendo con los avances en el diagnóstico genético, se ha logrado progresar en el descubrimiento de defectos genéticos asociados a trombopenias hereditarias con sangrado leve y que a menudo se detectan de forma incidental en un control analítico rutinario.

Gracias a estos avances, se ha permitido diagnosticar molecularmente hasta el 50% de estos pacientes con sospecha de trombopenias de origen congénito²³⁶. Este dato fue analizado por Balduini y Noris, en el que comparaban el porcentaje de diagnóstico molecular de las TH en 2000 y 2015. Tal y como se muestra en la imagen, se puede observar claramente un aumento de la tasa diagnóstica gracias a la mejora de las técnicas de diagnóstico molecular y al descubrimiento de nuevos genes asociado a este progreso.

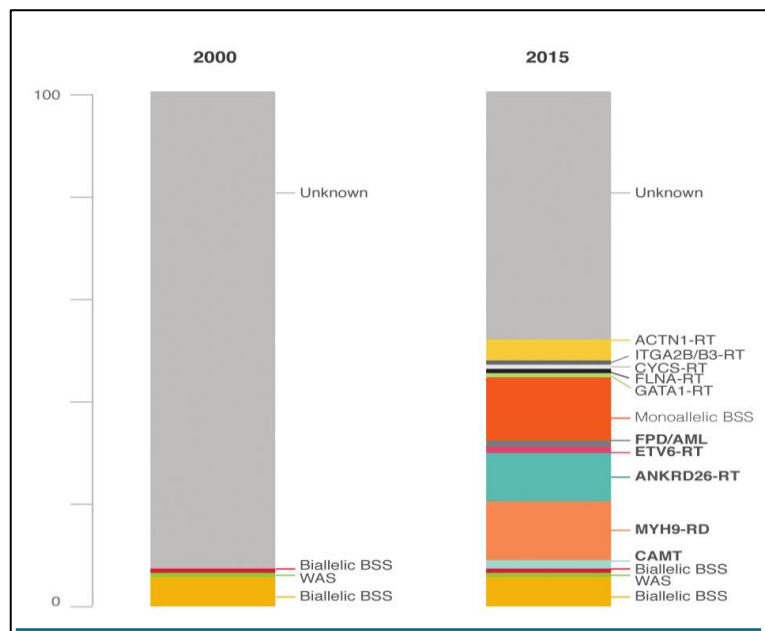


Imagen 6.5: Diferencias en el diagnóstico molecular de TH del año 2000 al 2015.

Extraído de Balduini CL, Noris P. Haematologica. 2016;101(1):2-4.

Además, un dato muy interesante que han aportado estos análisis es que la mayoría de las familias con TC tienen variantes causales en *MYH9*, *ANKRD26*, *ACTN1* y formas heterocigotas de SBS. De esta forma, los datos de este trabajo estarían en consonancia con lo descrito en la literatura ya que el porcentaje de pacientes con demostración molecular es del 53% y el gen más frecuentemente mutado en nuestro caso ha sido *MYH9*, con un total de 4 pacientes diagnosticados.

En concreto, estos 4 casos fueron remitidos para estudio por macrotrombopenia, por lo que la sospecha inicial ya era elevada. Esto nos lleva a hablar de la alta correlación clínica y molecular que existe en este grupo, que no está descrita sólo en los casos de *MYH9*²³⁷. En un trabajo publicado por Simeoni y colaboradores²³⁸, se estudian un total de 63 genes asociados a trastornos de la hemostasia en una serie de 300 pacientes, de los cuales 159 eran controles positivos y 141 no tenían demostración molecular. Estos 141 casos sin alteración molecular conocida, fueron divididos en dos grupos, uno con fenotipo definido y alta sospecha de alguna patología concreta y el otro estaba compuesto de aquellos pacientes sin diagnóstico definido. Lo interesante de este trabajo es la gran diferencia de detección molecular entre ambos grupos, mientras que en el primero se detectó la alteración molecular en el 92% de los casos, en el segundo sólo se alcanzó en el 10%.

Esto viene a confirmar que este tipo de patología tiene una alta correlación genotipo-fenotipo, lo que nos llevaría a pensar que una posible estrategia de diagnóstico molecular podría ser aquella basada en la caracterización fenotípica para luego orientar los estudios moleculares en uno u otro sentido. A propósito de esta idea, el trabajo de Favier y Raslova²³⁹ aportó algoritmos diagnósticos enfocados tanto a trombopenias que asocian anomalías físicas, a las que denominan TC sindrómicas, como a TC no sindrómicas. Este último grupo, que quizá es el más difícil de diagnosticar, es el que nos puede aportar un mayor conocimiento sobre la función plaquetaria y puede darnos información muy relevante sobre qué gen podría estar afecto (imagen 6.6).

lo que una vez más estamos ante casos clínicamente atípicos que finalmente son diagnosticados molecularmente de patologías que requieren intervenciones específicas. Este hecho hace destacar la importancia de incluir en estos estudios genes asociados a fenotipos más complejos, ya que la presentación clínica en muchos casos es muy variable e incluso puede pasar desapercibida.

Por este motivo, estudios NGS que incluyan genes asociados a TC con fenotipos típicos y atípicos, podrían detectar patologías que pueden no ser sospechadas en un primer momento. De hecho, en los últimos años se han descubierto nuevos genes asociados a TC, en concreto en el trabajo de Westbury y Mumford, describen un total de 50 (imagen 6.7)²⁴³. En este trabajo sólo se han incluido 11 genes relacionados con TC, por lo que ampliar este número podría ser una buena aproximación para intentar diagnosticar un mayor número de pacientes en esta patología.

Platelet number disorders*	Genes	Non-haematological manifestations
Amegakaryocytic thrombocytopenia with radio-ulnar synostosis 1 and 2 (#605432, #616738)	<i>HOXA11</i> , <i>MECOM</i>	Skeletal abnormalities
Autosomal dominant thrombocytopenia 2 (#188000)	<i>ANKRD26</i>	None
Autosomal dominant thrombocytopenia 4 (#612004)	<i>CYCS</i>	None
Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (#604498)	<i>MPL</i>	None
Dominant macrothrombocytopenia and hearing loss (no #)	<i>DIAPH1</i>	Sensorineural hearing impairment
Familial platelet disorder with associated myeloid malignancy (#601399)	<i>RUNX1</i>	None
Grey platelet syndrome (#139090)	<i>NBEAL2</i>	None
Inherited thrombocytopenia with early onset myelofibrosis (no #)	<i>SRC</i>	Skeletal abnormalities, dysmorphic facies
Inherited thrombocytopenia with excessive bleeding (no #)	<i>SLFN14</i>	None
Macrothrombocytopenia (no # for isolated platelet phenotype)	<i>FLNA</i>	Periventricular nodular heterotopia, otopalatodigital syndrome
May-Hegglin anomaly and other MYH9-related disorders (#155100, #153640, #153650, #605249)	<i>MYH9</i>	Cataract, renal dysfunction, sensorineural hearing impairment
Paris-Trousseau type thrombocytopenia and Jacobson syndrome (#188025, #147791)	<i>FLII</i>	Multiple features including developmental delay, skeletal abnormalities, congenital cardiac defects
Platelet-type bleeding disorder 15 (#615193)	<i>ACTN1</i>	None
Platelet-type bleeding disorder 17 (#187900)	<i>GPIIB</i>	None
Pseudo-von Willebrand disease (#177820)	<i>GPIBA</i>	None
Stormorken syndrome (#185070)	<i>STIM1</i>	Myopathy, miosis, asplenia, ichthyosis
Thrombocytopenia 5 (#616216)	<i>ETV6</i>	Solid organ malignancy
Thrombocytopenia absent radius syndrome (#274000)	<i>RBM8A</i>	Skeletal abnormalities, congenital cardiac defects
<i>TUBB1</i> -related autosomal dominant macrothrombocytopenia (#613112)	<i>TUBB1</i>	None
Wiskott-Aldrich syndrome (#301000)	<i>WAS</i>	Immune deficiency, eczema

Platelet function disorder*	Genes	Non-haematological manifestations
Arthrogryposis, renal dysfunction and cholestasis 1 and 2 (#208085, #613404)	<i>VPS33B</i> ; <i>VIPAS39</i>	Arthrogryposis, renal dysfunction, cholestasis
Bernard-Soulier syndrome (#231200)	<i>GPIBA</i> ; <i>GPIIB</i> ; <i>GP9</i>	None
Chediak-Higashi syndrome (#214500)	<i>LYST</i>	Partial albinism, impaired phagocytosis
Deficiency of phospholipase A2, group IVA (no #)	<i>PLA2G4A</i>	None
Dense granule abnormalities (no #)	<i>NBEA</i>	None
Familial haemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (#613101)	<i>STXBP2</i>	None
Ghosal haematodysplasia dysplasia (#231095)	<i>TBXAS1</i>	Skeletal abnormalities
Glanzmann thrombasthenia (#273800)	<i>ITGA2B</i> ; <i>ITGB3</i>	None
Hermansky-Pudlak syndromes 1-9 (#203300, #608233, #614072, #614073, #614074, #614075, #614076, #614077, #614171)	<i>HPS1</i> ; <i>AP3B1</i> ; <i>HPS3</i> ; <i>HPS4</i> ; <i>HPS5</i> ; <i>HPS6</i> ; <i>DTNBP1</i> ; <i>BLOC1S3</i> ; <i>BLOC1S6</i>	Oculocutaneous albinism, pulmonary fibrosis, colitis (dependent on subtype)
Leucocyte integrin adhesion deficiency, type III (#612840)	<i>FERMT3</i>	None
PAR4 defect (no #)	<i>F2RL3</i>	None
Platelet-type bleeding disorder 8 (#609821)	<i>P2RY12</i>	None
Platelet-type bleeding disorder 11 (#614201)	<i>GP6</i>	None
Platelet-type bleeding disorder 13 (#614009)	<i>TBXA2R</i>	None
Platelet-type bleeding disorder 18 (#615888)	<i>RASGRP2</i>	None
Quebec platelet disorder (#601709)	<i>PLAU</i>	None
Scott syndrome (#262890)	<i>ANO6</i>	None

Imagen 6.7: Genes asociados a TC descritos por Westbury y Mumford .

6.8 Diagnóstico molecular e implicaciones clínicas de los SFMC

Como se ha comentado, en este trabajo se ha llegado a identificar la alteración molecular en aproximadamente la mitad de los pacientes estudiados. Tanto en el grupo FMD como FMI, la correlación entre la sospecha clínica y el diagnóstico final fue adecuada, ya que tan solo un caso fue reclasificado de trombopenia a ABD.

Sin embargo, aunque en el resto de pacientes coincidiera el motivo del estudio y el diagnóstico molecular, es importante destacar que la detección de la alteración molecular en algunos casos ha implicado un cambio en el manejo clínico del paciente. Por ejemplo, los pacientes en los que se ha confirmado el diagnóstico de AF deberán someterse a controles periódicos con el objetivo de realizar un seguimiento estrecho de detección precoz de cáncer, en concreto de cabeza y cuello, que son los más prevalentes en esta patología¹⁰⁹, incluso algunos de ellos deberán someterse a un procedimiento de TPH por el alto riesgo de evolución a SMD/LMA. De la misma forma que los pacientes diagnosticados de DC deberán tener un seguimiento a largo plazo para vigilar la aparición del fallo de médula ósea, así como el desarrollo de fibrosis, tanto pulmonar como hepática, o la aparición de cáncer.

También es este el caso concreto del grupo de los pacientes estudiados por trombopenia en los que se ha detectado mutaciones en el gen *MYH9*. Como ya se ha comentado previamente, mutaciones en este gen se asocian a trastornos en la audición, aparición de cataratas y nefropatía que puede no ser clínicamente evidente en el momento del diagnóstico pero que pueden aparecer a lo largo de la vida. Este hecho implica el seguimiento crónico de estos pacientes por distintos especialistas²³⁷.

Por otra parte, es importante destacar que la tasa de enmiendas diagnósticas en este trabajo es muy baja, correspondiendo al 2% del total de pacientes estudiados, lo que difiere claramente de otras series publicadas en las que esta tasa se encuentra en torno al 10%^{138 141}. Sin embargo, aunque el número no sea elevado tiene implicaciones clínicas de suma importancia. En concreto, el caso en cuestión se trata de un paciente en estudio por trombopenia leve que finalmente es diagnosticado de ABD. Este hallazgo hace imprescindible el seguimiento estrecho del paciente por ser una patología asociada a un

aumento del riesgo de padecer cáncer, por lo que además del tratamiento específico que requeriría el desarrollo de anemia, probablemente en la edad adulta deba seguir un programa de detección precoz.

6.9 Pacientes no diagnosticados

En este trabajo, como se ha podido comprobar, no ha sido posible detectar la alteración molecular en la mitad de los casos estudiados, lo que puede tener varias explicaciones.

Por una parte, hay que destacar que la selección de pacientes ha venido dada por el criterio del médico especialista responsable, por lo que cabría esperar que un porcentaje importante de pacientes no esté afecto por una patología de origen congénito. Partiendo de esta premisa, se ha reinterrogado a los médicos responsables por la evolución clínica de los pacientes 2 años después de ser incluidos en este estudio. Tras esta consulta, se ha detectado un 22% de pacientes que no cumplen criterios clínicos de SFMC, e incluso algunos han tenido remisiones hematológicas espontáneas. Por tanto, es importante tener en cuenta que teniendo un criterio laxo de inclusión en este tipo de aproximaciones es más que probable que en un porcentaje importante de pacientes no hallemos alteración molecular simplemente por el hecho de que no estén afectados por ningún SFMC.

Aun así, sigue existiendo un número de pacientes con fenotipo de SFMC sin diagnóstico molecular. Esto podría deberse a las limitaciones técnicas inherentes a este tipo de aproximaciones diagnósticas, como mutaciones en regiones intrónicas que no estén cubiertas, genes en los que no se haya alcanzado una buena profundidad de lecturas, dificultad de las herramientas bioinformáticas para determinar la patogenicidad de variantes raras e incluso un conocimiento incompleto de los genes asociados al desarrollo de SFMC. Otra de las limitaciones es la detección de grandes inserciones y deleciones, aunque como ya se ha comentado anteriormente, puede ser posible detectarlas mediante un análisis exhaustivo de CNVs. Sin embargo, mediante esta herramienta es imposible detectar grandes deleciones o reordenamientos que solo pueden detectarse mediante otras aproximaciones como CGH array o SNP array.

Quizá, el descubrimiento de nuevos genes asociados al desarrollo de SFMC sea la mayor limitación para la detección de alteraciones moleculares mediante un panel NGS de genes ya definidos. En concreto, desde el diseño de este panel se han descubierto nuevos genes, por lo que probablemente habrá un número de pacientes afectados por alguno de estos genes que no han podido diagnosticarse mediante esta herramienta. Una forma

de solventar este problema, es incluirlos a medida que se van describiendo, sin embargo, esta actualización puede no ser viable dada la velocidad a la que se van descubriendo nuevos genes. Esta limitación no es exclusiva de este trabajo, si no que ya ha sido planteada por otros grupos que han intentado solventarla. Es el ejemplo del trabajo de Wang y colaboradores²⁴⁴, en el que estudian un total 98 pacientes con sospecha clínica de ABD. Inicialmente secuencian un total de 10 genes asociados a ABD a modo de *screening*, identificando la alteración molecular en 38 de los 98 pacientes, obteniendo así un ratio diagnóstico del 38%. Posteriormente, investigan la posibilidad de que los pacientes estén afectados por deleciones de gran tamaño que no pudieran ser detectadas mediante la técnica anterior. De esta forma identifican grandes deleciones en el 20% (12/60). Finalmente, realizan WES en los 48 pacientes sin diagnóstico, identificando mutaciones en el 25% (12/48) de los pacientes no diagnosticados en el punto anterior. Finalmente, tras la realización de las tres aproximaciones, el ratio de diagnóstico molecular final es del 63%. (62/98).

Por otra parte, el trabajo de Muramatsu intenta solventar el problema de la detección de genes no descritos realizando directamente WES en un grupo de 250 pacientes con sospecha de SFMC. Este grupo reporta una tasa diagnóstica mediante esta aproximación del 27% (68/250). Podría esperarse que la tasa diagnóstica mediante esta aproximación sea más elevada que la alcanzada mediante la secuenciación de un panel de genes, sin embargo, esto no es lo que reporta el grupo japonés. En ese mismo trabajo, su tasa de detección molecular en otro grupo de pacientes mediante un panel de genes es del 44%. Por este motivo, una estrategia razonable para intentar mejorar el diagnóstico molecular en estas patologías podría ser la seguida por el grupo de Wang. Sin embargo, aun con las técnicas de WES, continúa habiendo un porcentaje de pacientes sin diagnóstico.

6.10 Ventajas y limitaciones del estudio

Como se ha podido comprobar a lo largo de todo el trabajo, parece que las herramientas NGS, en concreto el panel de genes, parecen ser herramientas útiles para el diagnóstico de los SFMC. Sin embargo, este estudio presenta ciertas limitaciones.

En primer lugar, hay que señalar que una de las mayores limitaciones de este trabajo es la selección de pacientes. El tener un criterio de inclusión relativamente laxo puede hacer que se incluyan pacientes en el estudio que no estén afectados por ningún SFMC, lo que supone un sesgo a la hora de interpretar los resultados del estudio e implica un gasto de recursos innecesario. Sin embargo, este hecho puede tener la ventaja de detectar pacientes que a priori no presenten un fenotipo congénito típico e incluso pacientes asintomáticos que puedan desarrollar clínica de la enfermedad en la edad adulta, como son muchos casos de DC.

En segundo lugar, habría que añadir la limitación de realizar el estudio mediante un panel de genes diseñado, ya que puede haber pacientes afectados por genes no incluidos en el mismo que no podamos diagnosticar mediante esta estrategia. En este trabajo, como se ha podido comprobar, hay 2 pacientes que han sido diagnosticados mediante WES de genes no incluidos en este panel, como son *DNAJC21* y *SAMD9*, publicados en 2017⁷⁸²⁴⁵. Para solventar este problema, habría que valorar actualizar los genes incluidos en el panel anualmente o incluso plantear WES desde el principio. Esta última opción podría no ser la más adecuada en estudios con un criterio de inclusión como el propuesto en esta tesis, ya que podrían realizarse estudios en pacientes no afectados por ninguna patología de origen congénito. Sin embargo, una opción que parece razonable es utilizar un panel completo de genes como *screening* inicial para posteriormente seleccionar aquellos pacientes que pudieran ser candidatos a una secuenciación del exoma. No obstante, parece ser un hecho que los costes de las técnicas NGS han ido disminuyendo a lo largo de los años, por lo que podría esperarse que un futuro no muy lejano sea razonable utilizar herramientas como WES e incluso WGS de forma rutinaria.

En tercer lugar, otra de las limitaciones de este trabajo es el tipo de muestras con las que se ha trabajado. En todos los casos han sido muestras obtenidas de sangre periférica. Al tratarse del estudio de síndromes de origen congénito, sería más adecuado

trabajar con muestras obtenidas de tejido para confirmar el origen germinal de los hallazgos. Los casos de mosaicismo somático, que han sido descritos en SFMC como AF o DC, en el que una variante patogénica ha sufrido una reversión a un alelo funcional, pueden no detectarse en muestras de sangre periférica. En tales casos, las mutaciones de línea germinal se distinguen mejor mediante la secuenciación de un tejido no hematopoyético, como es el caso de los fibroblastos obtenidos de una biopsia de piel. Sin embargo, este tipo de muestras conlleva un procedimiento invasivo para el paciente y además requieren varias semanas de cultivo, por lo que no fueron consideradas para este estudio. Otras muestras de uso común, como la saliva o el uso de un hisopo bucal, tienen la desventaja de que son muestras con elevada probabilidad de contaminación por células sanguíneas, en concreto linfocitos. Por estos motivos, se optó por el estudio en ADN obtenido de sangre periférica, asumiendo el riesgo de no poder detectar casos de mosaicismo somático.

En cualquier caso, lo que sí parecen haber demostrado ampliamente las técnicas NGS es que son herramientas útiles para el diagnóstico molecular de los SFMC. En concreto, los paneles de genes son capaces de identificar la alteración molecular en un alto porcentaje de pacientes y en la actualidad son una opción más que razonable como prueba de *screening* previa a la realización de estudios más complejos orientados al descubrimiento de nuevos genes como la secuenciación del exoma.

7. CONCLUSIONES

1. El panel de genes diseñado en este trabajo ha demostrado ser una herramienta sensible y específica para la detección de alteraciones moleculares en los SFMC, cumpliendo con los criterios de calidad establecidos.
2. El panel de secuenciación ha demostrado tener una adecuada capacidad diagnóstica al identificar la alteración molecular en un porcentaje importante de pacientes afectados de SFMC sin demostración genética previa, resultando por tanto una herramienta útil para el diagnóstico de rutina en estas patologías.
3. El rendimiento diagnóstico del panel NGS es diferente de acuerdo a los fenotipos clínicos de la enfermedad, teniendo mayor capacidad diagnóstica en aquellos cuadros clínicos mejor caracterizados. El mejor rendimiento se ha obtenido en los grupos de AF, ABD, DC y TC, siendo inferior en aquellos pacientes con fallo medular sin fenotipo clínico definido.
4. Se ha definido un circuito a nivel nacional centralizando el estudio molecular en un solo laboratorio para la realización del estudio de secuenciación dirigida a modo de cribado en aquellos pacientes con sospecha clínica de SFMC. Se ha diseñado un algoritmo para homogeneizar el análisis y clasificación de las variantes, permitiendo diagnosticar pacientes que carecían de diagnóstico molecular previo e identificar pacientes afectados de SFMC sin demostración molecular que puedan ser candidatos a participar en otros programas de investigación.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Dror Y. Inherited bone marrow failure syndromes. In: *Pediatric Hematology*. Oxford: Blackwell Publishing; 2006:30-36.
2. Alter B. Inherited bone marrow failure syndromes. In: *Nathan & Oski's Hematology of Infancy and Childhood, Vol 1, 7th Ed*. Philadelphia: WB Saunders; 2003:280-365.
3. Shimamura A, Alter BP. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev*. 2010;24(3):101-122. doi:10.1016/j.blre.2010.03.002
4. Tamary H, Nishri D, Yacobovich J, et al. Frequency and natural history of inherited bone marrow failure syndromes: The Israeli inherited bone marrow failure registry. *Haematologica*. 2010;95(8):1300-1307. doi:10.3324/haematol.2009.018119
5. Alter BP, Giri N, Savage SA, Rosenberg PS. Cancer in the national cancer institute inherited bone marrow failure syndrome cohort after fifteen years of follow-up. *Haematologica*. 2018;103(1):30-39. doi:10.3324/haematol.2017.178111
6. <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>.
7. Da Costa L, O'Donohue M-F, van Dooijeweert B, et al. Molecular approaches to diagnose Diamond-Blackfan anemia: The EuroDBA experience. *Eur J Med Genet*. October 2017. doi:10.1016/j.ejmg.2017.10.017
8. Dokal I, Vulliamy T. Inherited aplastic anaemias/bone marrow failure syndromes. *Blood Rev*. 2008;22(3):141-153. doi:10.1016/j.blre.2007.11.003
9. Alter BP. Diagnosis, genetics, and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:29-39. doi:10.1182/asheducation-2007.1.29
10. Wegman-Ostrosky T, Savage SA. The genomics of inherited bone marrow failure: from mechanism to the clinic. *Br J Haematol*. 2017;177(4):526-542. doi:10.1111/bjh.14535
11. Rio P. Bases moleculares de los síndrome congénitos con fallo de médula ósea y síndromes relacionados. In: *Hematología y Oncología Pediátricas. 3.ª Edición*. Madrid: Ergon; 2015:31-45.
12. Zhang Y, Morimoto K, Danilova N, Zhang B, Lin S. Zebrafish models for dyskeratosis congenita reveal critical roles of p53 activation contributing to hematopoietic defects

- through RNA processing. *PLoS One*. 2012;7(1). doi:10.1371/journal.pone.0030188
13. Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. - PubMed - NCBI. *Clin Obs Interv Ther Trials*. 2003;101(3):822-826. doi:10.1182/blood-2002-05-1498.Reprints
 14. Alter BP, Giri N, Savage SA, Rosenberg PS. Cancer in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndrome cohort after 15 years of follow-up. *Haematologica*. 2017;haematol.2017.178111. doi:10.3324/haematol.2017.178111
 15. Vlachos A, Rosenberg PS, Atsidaftos E, Alter BP, Lipton JM. Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia: a report from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Blood*. 2012;119(16):3815-3819. doi:10.1182/blood-2011-08-375972
 16. Draptchinskaia, N; Gustavsson, P; Andersson, B; Pettersson, M; Willig, T N; Dianzani, I; Ball, S; Tchernia, G; Klar, J; Matsson, H; Tentler, D; Mohandas, N; Carlsson, B; Dahl N. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet*. 1999;21(2):169-175.
 17. Boocock GRB, Morrison JA, Popovic M, et al. Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nat Genet*. 2003;33(1):97-101. doi:10.1038/ng1062
 18. Vulliamy TJ, Dokal I. Dyskeratosis congenita: the diverse clinical presentation of mutations in the telomerase complex. *Biochimie*. 2008;90(1):122-130. doi:10.1016/j.biochi.2007.07.017
 19. de Winter JP, Joenje H. The genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2009;668(1-2):11-19. doi:10.1016/j.mrfmmm.2008.11.004
 20. Tsangaris E, Klaassen R, Fernandez C V., et al. Genetic analysis of inherited bone marrow failure syndromes from one prospective, comprehensive and population-based cohort and identification of novel mutations. *J Med Genet*. 2011;48(9):618-628. doi:10.1136/jmg.2011.089821
 21. Smith AR, Wagner JE. Current clinical management of Fanconi anemia. *Expert Rev Hematol*. 2012;5(5):513-522. doi:10.1586/ehm.12.48
 22. Madero L. Anemia aplásica congénita. Síndromes de fracaso medular congénito. In: *Hematología y Oncología Pediátricas*. 3.^a Edición. Ergon; 2015:47-65.
 23. Kutler DI, Singh B, Satagopan J, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*. 2003;101(4):1249-1256. doi:10.1182/blood-2002-07-

2170

24. Mehta PA, Tolar J. *Fanconi Anemia.*; 1993.
25. Rochowski A, Rosenberg PS, Alonzo TA, Gerbing RB, Lange BJ, Alter BP. Estimation of the prevalence of Fanconi anemia among patients with de novo acute myelogenous leukemia who have poor recovery from chemotherapy. *Leuk Res.* 2012. doi:10.1016/j.leukres.2011.09.009
26. Alter BP, Giri N, Savage SA, et al. Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. *Br J Haematol.* 2010;150(2):179-188. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08212.x
27. Domchek SM, Tang J, Stopfer J, et al. Biallelic deleterious BRCA1 mutations in a woman with early-onset ovarian cancer. *Cancer Discov.* 2013. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0421
28. Meetei AR, Levitus M, Xue Y, et al. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet.* 2004. doi:10.1038/ng1458
29. Ameziane N, May P, Haitjema A, et al. A novel Fanconi anaemia subtype associated with a dominant-negative mutation in RAD51. *Nat Commun.* 2015. doi:10.1038/ncomms9829
30. Bluteau D, Masliah-Planchon J, Clairmont C, et al. Biallelic inactivation of REV7 is associated with Fanconi anemia. *J Clin Invest.* 2016. doi:10.1172/JCI88010
31. Castella M, Pujol R, Callén E, et al. Origin, functional role, and clinical impact of Fanconi anemia FANCA mutations. (Supplemental Information). *Blood.* 2011;117(14):3759-3769. doi:10.1182/blood-2010-08-299917
32. Deans AJ, West SC. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011. doi:10.1038/nrc3088
33. Rodríguez A, Torres L, Juárez U, et al. Fanconi anemia cells with unrepaired DNA damage activate components of the checkpoint recovery process. *Theor Biol Med Model.* 2015. doi:10.1186/s12976-015-0011-4
34. Barnum JL, Petryk A, Zhang L, et al. Endocrinopathies, Bone Health, and Insulin Resistance in Patients with Fanconi Anemia after Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(8):1487-1492. doi:10.1016/j.bbmt.2016.05.004
35. Lopez-Martinez D, Liang C-C, Cohn MA. Cellular response to DNA interstrand

- crosslinks: the Fanconi anemia pathway. *Cell Mol Life Sci*. 2016. doi:10.1007/s00018-016-2218-x
36. Wu Z-H. Phenotypes and genotypes of the chromosomal instability syndromes. *Transl Pediatr*. 2016. doi:10.21037/tp.2016.03.04
 37. Auerbach AD. FA and its diagnosis. *Mutat Res*. 2010;668:4-10. doi:10.1016/j.mrfmmm.2009.01.013.Fanconi
 38. Herman TE, McAlister WH, Mallory SB. Dyskeratosis congenita. *Pediatr Radiol*. 1997;27(3):286. doi:10.1055/s-2008-1046495
 39. Alter BP, Giri N, Savage SA, Rosenberg PS. Cancer in dyskeratosis congenita Cancer in dyskeratosis congenita. 2009;113(26):6549-6557. doi:10.1182/blood-2008-12-192880
 40. Dokal I. Dyskeratosis congenita. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*. 2011;2011:480-486. doi:10.1182/asheducation-2011.1.480
 41. Soledad Fernández García M, Teruya-Feldstein J. JBM-47437-the-diagnosis-and-treatment-of-dyskeratosis-congenita---a-re. *J Blood Med*. 2014;5:157-167. doi:10.2147/JBM.S47437
 42. Martínez P, Blasco MA. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat Rev Cancer*. 2011. doi:10.1038/nrc3025
 43. Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*. 1999;402(6761):551-555. doi:10.1038/990141
 44. Yamaguchi H, Baerlocher GM, Lansdorp PM, et al. Mutations of the human telomerase RNA gene (TERC) in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2003;102(3):916-918. doi:10.1182/blood-2003-01-0335
 45. Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, et al. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N Engl J Med*. 2005;352(14):1413-1424. doi:10.1056/NEJMoa042980
 46. Marrone A, Stevens D, Vulliamy T, Dokal I, Mason PJ. Heterozygous telomerase RNA mutations found in dyskeratosis congenita and aplastic anemia reduce telomerase activity via haploinsufficiency. *Blood*. 2004;104(13):3936-3942. doi:10.1182/blood-2004-05-1829
 47. Vulliamy TJ, Walne A, Baskaradas A, Mason PJ, Marrone A, Dokal I. Mutations in the

- reverse transcriptase component of telomerase (TERT) in patients with bone marrow failure. *Blood Cells Mol Dis.* 34(3):257-263. doi:10.1016/j.bcmd.2004.12.008
48. Walne AJ, Vulliamy T, Marrone A, et al. Genetic heterogeneity in autosomal recessive dyskeratosis congenita with one subtype due to mutations in the telomerase-associated protein NOP10. *Hum Mol Genet.* 2007;16(13):1619-1629. doi:10.1093/hmg/ddm111
 49. Savage SA, Giri N, Baerlocher GM, Orr N, Lansdorp PM, Alter BP. TINF2, a Component of the Shelterin Telomere Protection Complex, Is Mutated in Dyskeratosis Congenita. *Am J Hum Genet.* 2008;82(2):501-509. doi:10.1016/j.ajhg.2007.10.004
 50. Anderson BH, Kasher PR, Mayer J, et al. Mutations in CTC1, encoding conserved telomere maintenance component 1, cause Coats plus. *Nat Genet.* 2012;44(3):338-342. doi:10.1038/ng.1084
 51. Savage SA. Connecting complex disorders through biology. *Nat Genet.* 2012;44(3):238-240. doi:10.1038/ng.2206
 52. Ballew BJ, Yeager M, Jacobs K, et al. Germline mutations of regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, in Dyskeratosis congenita. *Hum Genet.* 2013;132(4):473-480. doi:10.1007/s00439-013-1265-8
 53. Deng Z, Glousker G, Molczan A, et al. Inherited mutations in the helicase RTEL1 cause telomere dysfunction and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(36):E3408-16. doi:10.1073/pnas.1300600110
 54. Le Guen T, Jullien L, Touzot F, et al. Human RTEL1 deficiency causes Hoyeraal-Hreidarsson syndrome with short telomeres and genome instability. *Hum Mol Genet.* 2013;22(16):3239-3249. doi:10.1093/hmg/ddt178
 55. Walne AJ, Vulliamy T, Kirwan M, Plagnol V, Dokal I. Constitutional mutations in RTEL1 cause severe dyskeratosis congenita. *Am J Hum Genet.* 2013;92(3):448-453. doi:10.1016/j.ajhg.2013.02.001
 56. Guo Y, Kartawinata M, Li J, et al. Inherited bone marrow failure associated with germline mutation of ACD, the gene encoding telomere protein TPP1. *Blood.* 2014;124(18):2767-2774. doi:10.1182/blood-2014-08-596445
 57. Kocak H, Ballew BJ, Bisht K, et al. Hoyeraal-Hreidarsson syndrome caused by a germline mutation in the TEL patch of the telomere protein TPP1. *Genes Dev.* 2014;28(19):2090-2102. doi:10.1101/gad.248567.114

58. Stuart BD, Choi J, Zaidi S, et al. Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. *Nat Genet.* 2015;47(5):512-517. doi:10.1038/ng.3278
59. Simon AJ, Lev A, Zhang Y, et al. Mutations in STN1 cause Coats plus syndrome and are associated with genomic and telomere defects. *J Exp Med.* 2016;213(8):1429-1440. doi:10.1084/jem.20151618
60. Takai H, Jenkinson E, Kabir S, et al. A POT1 mutation implicates defective telomere end fill-in and telomere truncations in Coats plus. *Genes Dev.* 2016;30(7):812-826. doi:10.1101/gad.276873.115
61. Manuscript A. Genomic Characterization of the Inherited Bone Marrow Failure Syndromes. 2014;50(4):1-22. doi:10.1053/j.seminhematol.2013.09.002.Genomic
62. Bertuch AA. The molecular genetics of the telomere biology disorders. *RNA Biol.* 2016. doi:10.1080/15476286.2015.1094596
63. Alter BP, Baerlocher GM, Savage S a, et al. Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. *Blood.* 2011;110(5):1439-1447. doi:10.1182/blood-2007-02-075598
64. SHWACHMAN H, DIAMOND LK, OSKI FA, KHAW KT. THE SYNDROME OF PANCREATIC INSUFFICIENCY AND BONE MARROW DYSFUNCTION. *J Pediatr.* 1964;65:645-663. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14221166>.
65. Burroughs MD, Woolfrey A, Shimamura A. Shwachman Diamond Syndrome – a review of the clinical presentation, molecular pathogenesis, diagnosis, and treatmentblic Access. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009;23(Suppl 2):233-248. doi:10.1016/j.hoc.2009.01.007
66. Madero L. *Hematología y Oncología Pediátrica*. 3rd ed. Madrid: Ergon; 2015.
67. Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B, et al. Classification of and risk factors for hematologic complications in a French national cohort of 102 patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Haematologica.* 2012;97(9):1312-1319. doi:10.3324/haematol.2011.057489
68. Woloszynek JR, Rothbaum RJ, Rawls AS, et al. Mutations of the SBDS gene are present

- in most patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Blood*. 2004. doi:10.1182/blood-2004-04-1516
69. Ruggero D, Shimamura A. Marrow failure: a window into ribosome biology. 2018;124(18):2784-2793. doi:10.1182/blood-2014-04-526301.2784
 70. Sezgin G, Henson AL, Nihrane A, et al. Impaired growth, hematopoietic colony formation, and ribosome maturation in human cells depleted of Shwachman-Diamond syndrome protein SBDS. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60(2):281-286. doi:10.1002/pbc.24300
 71. Finch AJ, Hilcenko C, Basse N, et al. Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome. *Genes Dev*. 2011;25(9):917-929. doi:10.1101/gad.623011
 72. Dror Y, Freedman MH. Shwachman-Diamond syndrome: An inherited preleukemic bone marrow failure disorder with aberrant hematopoietic progenitors and faulty marrow microenvironment. *Blood*. 1999;94(9):3048-3054.
 73. Zhang S, Shi M, Hui C -c., Rommens JM. Loss of the Mouse Ortholog of the Shwachman-Diamond Syndrome Gene (Sbds) Results in Early Embryonic Lethality. *Mol Cell Biol*. 2006;26(17):6656-6663. doi:10.1128/MCB.00091-06
 74. Marc H.G.P. Raaijmakers, Siddhartha Mukherjee, Shangqin Guo S, Zhang, Tatsuya Kobayashi, Jesse A. Schoonmaker, Benjamin L. Ebert FA, Robert P. Hasserjian, Edward O. Scadden, Zinmar Aung M, Matza, Matthias Merkenschlager, Charles Lin, Johanna M. Rommens and DT, Scadden. HHS Public Access. 2012;464(7290):852-857. doi:10.1038/nature08851.Bone
 75. Austin KM, Gupta ML, Coats SA, et al. Mitotic spindle destabilization and genomic instability in Shwachman-Diamond syndrome. *J Clin Invest*. 2008;118(4):1511-1518. doi:10.1172/JCI33764
 76. Woloszynek JR, Rothbaum RJ, Rawls AS, et al. Mutations of the SBDS gene are present in most patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Blood*. 2004;104(12):3588-3590. doi:10.1182/blood-2004-04-1516
 77. Tummala H, Walne AJ, Williams M, et al. DNAJC21 Mutations Link a Cancer-Prone Bone Marrow Failure Syndrome to Corruption in 60S Ribosome Subunit Maturation. *Am J Hum Genet*. 2016;99(1):115-124. doi:10.1016/j.ajhg.2016.05.002

78. Dhanraj S, Matveev A, Li H, et al. Biallelic mutations in DNAJC21 cause Shwachman-Diamond syndrome. *Blood*. 2017;129(11):1557-1562. doi:10.1182/blood-2016-08-735431
79. Stepensky P, Chacón-Flores M, Kim KH, et al. Mutations in EFL1, an SBDS partner, are associated with infantile pancytopenia, exocrine pancreatic insufficiency and skeletal anomalies in a Shwachman-Diamond like syndrome. *J Med Genet*. 2017;54(8):558-566. doi:10.1136/jmedgenet-2016-104366
80. Diamond LK, Blackfan KD. ^ (1938). "Hypoplastic anemia". 56: 464–467. *Am J Dis Child*. 1938;56:464-467.
81. Diamond LK. Congenital hypoplastic anemia: Diamond-Blackfan syndrome. Historical and clinical aspects. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):209-213.
82. Campagnoli MF, Garelli E, Quarello P, et al. Molecular basis of Diamond-Blackfan anemia: new findings from the Italian registry and a review of the literature. *Haematologica*. 2004;89(4):480-489. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075082>.
83. Clinton C, Gazda HT. *Diamond-Blackfan Anemia*.; 1993. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301769>.
84. Vlachos A, Blanc L, Lipton JM. Diamond blackfan anemia: A model for the translational approach to understanding human disease. *Expert Rev Hematol*. 2014;7(3):359-372. doi:10.1586/17474086.2014.897923
85. Vlachos A, Muir E. How I treat How I treat Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2010;116(19):3715-3723. doi:10.1182/blood-2010-02-251090.
86. Fargo JH, Kratz CP, Giri N, et al. Erythrocyte adenosine deaminase: diagnostic value for Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 2013;160(4):547-554. doi:10.1111/bjh.12167
87. Vlachos A, Ball S, Dahl N, et al. Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: Results of an international clinical consensus conference. *Br J Haematol*. 2008;142(6):859-876. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07269.x
88. Lipton JM, Ellis SR. Diamond-Blackfan anemia: diagnosis, treatment, and molecular pathogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009;23(2):261-282. doi:10.1016/j.hoc.2009.01.004
89. Chirmomas SD, Kupfer GM. The inherited bone marrow failure syndromes.

- PediatrClinNorth Am.* 2013;60(1557-8240 (Electronic)):1291-1310. doi:10.1016/j.pcl.2013.09.007
90. Gustavsson P, Skeppner G, Johansson B, et al. Diamond-Blackfan anaemia in a girl with a de novo balanced reciprocal X;19 translocation. *J Med Genet.* 1997;34(9):779-782.
 91. Farrar JE, Vlachos A, Atsidaftos E, et al. Ribosomal protein gene deletions in Diamond-Blackfan anemia. 2015;118(26):6943-6952. doi:10.1182/blood-2011-08-375170.The
 92. Landowski M, O'Donohue MF, Buros C, et al. Novel deletion of RPL15 identified by array-comparative genomic hybridization in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Genet.* 2013. doi:10.1007/s00439-013-1326-z
 93. Sankaran VG, Ghazvinian R, Do R, et al. Exome Sequencing Identifies GATA1 Mutations Resulting in Diamond- - - Blackfan Anemia. *J Clin Invest.* 2012;122(7):1-5. doi:10.1172/JCI63597DS1
 94. Mirabello L, Macari ER, Jessop L, et al. Whole-exome sequencing and functional studies identify RPS29 as a novel gene mutated in multicase Diamond-Blackfan anemia families. *Blood.* 2014;124(1):24-32. doi:10.1182/blood-2013-11-540278
 95. Gripp KW, Curry C, Olney AH, et al. Diamond-Blackfan anemia with mandibulofacial dystostosis is heterogeneous, including the novel DBA genes TSR2 and RPS28. *Am J Med Genet Part A.* 2014;164(9):2240-2249. doi:10.1002/ajmg.a.36633
 96. Danilova N, Gazda HT. Ribosomopathies: how a common root can cause a tree of pathologies. *Dis Model Mech.* 2015;8(9):1013-1026. doi:10.1242/dmm.020529
 97. Quarello P, Garelli E, Brusco A, et al. High frequency of ribosomal protein gene deletions in Italian Diamond-Blackfan anemia patients detected by multiplex ligation-dependent probe amplification assay. *Haematologica.* 2012;97(12):1813-1817. doi:10.3324/haematol.2012.062281
 98. Ivanova A, Wuerfel J, Zhang J, Hoffmann O, Ballmaier M, Dame C. Expression pattern of the thrombopoietin receptor (Mpl) in the murine central nervous system. *BMC Dev Biol.* 2010;10:77. doi:10.1186/1471-213X-10-77
 99. Ballmaier M, Germeshausen M, Schulze H, et al. C- Mpl Mutations Are the Cause of Congenital Amegakaryocytic Thrombocytopenia. *Blood.* 2001;97(1):139-147. doi:10.1182/blood.V97.1.139
 100. Muraoka K, Ishii E, Tsuji K, et al. Defective response to thrombopoietin and impaired

- expression of c-mpl mRNA of bone marrow cells in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 1997;96(2):287-292. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9029014>.
101. Al-Qahtani FS. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: A brief review of the literature. *Clin Med Insights Pathol.* 2010;(3):25-30. doi:10.4137/CPath.S4972
 102. Donadieu J, Beaupain B, Mahlaoui N, Bellanné-Chantelot C. Epidemiology of congenital neutropenia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2013;27(1):1-17, vii. doi:10.1016/j.hoc.2012.11.003
 103. Donadieu J, Beaupain B, Fenneteau O, Bellanné-Chantelot C. Congenital neutropenia in the era of genomics: classification, diagnosis, and natural history. *Br J Haematol.* 2017;179(4):557-574. doi:10.1111/bjh.14887
 104. Dale DC, Cottle TE, Fier CJ, et al. Severe chronic neutropenia: treatment and follow-up of patients in the Severe Chronic Neutropenia International Registry. *Am J Hematol.* 2003;72(2):82-93. doi:10.1002/ajh.10255
 105. Teo JT, Klaassen R, Fernandez C V., et al. Clinical and Genetic Analysis of Unclassifiable Inherited Bone Marrow Failure Syndromes. *Pediatrics.* 2008;122(1):e139-e148. doi:10.1542/peds.2007-3415
 106. Zhang J, Barbaro P, Guo Y, et al. Utility of next-generation sequencing technologies for the efficient genetic resolution of haematological disorders. *Clin Genet.* 2016;89(2):163-172. doi:10.1111/cge.12573
 107. Bluteau O, Sebert M, Leblanc T, et al. A landscape of germ line mutations in a cohort of inherited bone marrow failure patients. *Blood.* 2018;131(7):717-732. doi:10.1182/blood-2017-09-806489
 108. Myers KC, Davies SM. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Bone Marrow Failure Syndromes in Children. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15(3):279-292. doi:10.1016/j.bbmt.2008.11.037
 109. Rosenberg PS, Socie G, Alter BP, Gluckman E. Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. *Blood.* 2005. doi:10.1182/blood-2004-04-1652
 110. Shimamura A. Clinical approach to marrow failure. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009:329-337. doi:10.1182/asheducation-2009.1.329

111. Dokal I. Dyskeratosis congenita in all its forms. *Br J Haematol.* 2000;110(4):768-779. doi:10.1046/j.1365-2141.2000.02109.x
112. Savage SA, Alter BP. Dyskeratosis congenita. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009;23(2):215-231. doi:10.1016/j.hoc.2009.01.003
113. Nakanishi K, Taniguchi T, Ranganathan V, et al. Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nat Cell Biol.* 2002;4(12):913-920. doi:10.1038/ncb879
114. Lo Ten Foe JR, Kwee ML, Rooimans MA, et al. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance. *Eur J Hum Genet.* 5(3):137-148.
115. Gregory JJ, Wagner JE, Verlander PC, et al. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(5):2532-2537. doi:10.1073/pnas.051609898
116. Ip WF, Dupuis A, Ellis L, et al. Serum pancreatic enzymes define the pancreatic phenotype in patients with Shwachman-Diamond syndrome. *J Pediatr.* 2002;141(2):259-265. doi:10.1067/mpd.2002.125849
117. Rothbaum R, Perrault J, Vlachos A, et al. Shwachman-Diamond syndrome: report from an international conference. *J Pediatr.* 2002;141(2):266-270. doi:10.1067/mpd.2002.125850
118. Glader BE, Backer K, Diamond LK. Elevated erythrocyte adenosine deaminase activity in congenital hypoplastic anemia. *N Engl J Med.* 1983;309(24):1486-1490. doi:10.1056/NEJM198312153092404
119. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-5467.
120. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975;94(3):441-448.
121. Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science.* 1981;214(4526):1205-1210.
122. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med.* 2013;15(9):733-747. doi:10.1038/gim.2013.92
123. Cordero P, Ashley EA. Whole-genome sequencing in personalized therapeutics. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;91(6):1001-1009. doi:10.1038/clpt.2012.51

124. Sikkema-Raddatz B, Johansson LF, de Boer EN, et al. Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Hum Mutat.* 2013;34(7):1035-1042. doi:10.1002/humu.22332
125. Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 2013;6:287-303. doi:10.1146/annurev-anchem-062012-092628
126. Schloss JA. How to get genomes at one ten-thousandth the cost. *Nat Biotechnol.* 2008;26(10):1113-1115. doi:10.1038/nbt1008-1113
127. Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature.* 2005;437(7057):376-380. doi:10.1038/nature03959
128. Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* 2008;24(3):133-141. doi:10.1016/j.tig.2007.12.007
129. Ju J, Kim DH, Bi L, et al. Four-color DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(52):19635-19640. doi:10.1073/pnas.0609513103
130. Clarke J, Wu H-C, Jayasinghe L, Patel A, Reid S, Bayley H. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat Nanotechnol.* 2009;4(4):265-270. doi:10.1038/nnano.2009.12
131. Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA. Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(5):490-497. doi:10.1038/ejhg.2011.258
132. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet.* 2003;33 Suppl:228-237. doi:10.1038/ng1090
133. Horner DS, Pavesi G, Castrignanò T, et al. Bioinformatics approaches for genomics and post genomics applications of next-generation sequencing. *Brief Bioinform.* 2010;11(2):181-197. doi:10.1093/bib/bbp046
134. Ku CS, Naidoo N, Pawitan Y. Revisiting Mendelian disorders through exome sequencing. *Hum Genet.* 2011;129(4):351-370. doi:10.1007/s00439-011-0964-2
135. Taneri B, Asilmaz E, Gaasterland T. Biomedical impact of splicing mutations revealed through exome sequencing. *Mol Med.* 2012;18:314-319. doi:10.2119/molmed.2011.00126

136. Lelieveld SH, Spielmann M, Mundlos S, Veltman JA, Gilissen C. Comparison of Exome and Genome Sequencing Technologies for the Complete Capture of Protein-Coding Regions. *Hum Mutat.* 2015;36(8):815-822. doi:10.1002/humu.22813
137. Zhao M, Wang Q, Wang Q, Jia P, Zhao Z. Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: features and perspectives. *BMC Bioinformatics.* 2013;14 Suppl 1:S1. doi:10.1186/1471-2105-14-S11-S1
138. Ghemlas I, Li H, Zlateska B, et al. Improving diagnostic precision, care and syndrome definitions using comprehensive next-generation sequencing for the inherited bone marrow failure syndromes. *J Med Genet.* 2015;52(9):575-584. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103270
139. Zhang MY, Keel SB, Walsh T, et al. Genomic analysis of bone marrow failure and myelodysplastic syndromes reveals phenotypic and diagnostic complexity. *Haematologica.* 2015;100(1):42-48. doi:10.3324/haematol.2014.113456
140. Keel SB, Scott A, Bonilla MS, et al. Genetic features of myelodysplastic syndrome and aplastic anemia in pediatric and young adult patients. *Haematologica.* 2016;101(11):1343-1350. doi:10.3324/haematol.2016.149476
141. Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, et al. Clinical utility of next-generation sequencing for inherited bone marrow failure syndromes. *Genet Med.* 2017;19(7):796-802. doi:10.1038/gim.2016.197
142. Matthijs G, Souche E, Alders M, et al. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet.* 2015;24:2.
143. Beck TF, Mullikin JC, NISC Comparative Sequencing Program, Biesecker LG. Systematic Evaluation of Sanger Validation of Next-Generation Sequencing Variants. *Clin Chem.* 2016;62(4):647-654. doi:10.1373/clinchem.2015.249623
144. Gullapalli RR, Desai K V, Santana-Santos L, Kant JA, Becich MJ. Next generation sequencing in clinical medicine: Challenges and lessons for pathology and biomedical informatics. *J Pathol Inform.* 2012;3:40. doi:10.4103/2153-3539.103013
145. Gargis AS, Kalman L, Berry MW, et al. Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice. *Nat Biotechnol.* 2012;30(11):1033-1036. doi:10.1038/nbt.2403
146. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.*

- 2012;9(4):357-359. doi:10.1038/nmeth.1923
147. No Title.
 148. McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20(9):1297-1303. doi:10.1101/gr.107524.110
 149. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(16):e164-e164. doi:10.1093/nar/gkq603
 150. Liu X, Wu C, Li C, Boerwinkle E. dbNSFP v3.0: A One-Stop Database of Functional Predictions and Annotations for Human Nonsynonymous and Splice-Site SNVs. *Hum Mutat.* 2016;37(3):235-241. doi:10.1002/humu.22932
 151. Lek M, Karczewski KJ, Minikel E V., et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536(7616):285-291. doi:10.1038/nature19057
 152. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S. ACMG Standards and Guidelines Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. 2015;(December 2014):1-20. doi:10.1038/gim.2015.30
 153. Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, et al. Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet.* 2008;83(6):769-780. doi:10.1016/j.ajhg.2008.11.004
 154. DBA Database. <http://www.dbagenes.unito.it/home.php>.
 155. Willig TN, Draptchinskaia N, Dianzani I, et al. Mutations in ribosomal protein S19 gene and diamond blackfan anemia: wide variations in phenotypic expression. *Blood.* 1999;94(12):4294-4306. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10590074>.
 156. Cmejla R, Blafkova J, Stopka T, et al. Ribosomal protein S19 gene mutations in patients with diamond-blackfan anemia and identification of ribosomal protein S19 pseudogenes. *Blood Cells Mol Dis.* 2000;26(2):124-132. doi:10.1006/bcmd.2000.0286
 157. Doherty L, Sheen MR, Vlachos A, et al. Ribosomal Protein Genes RPS10 and RPS26 Are Commonly Mutated in Diamond-Blackfan Anemia. *Am J Hum Genet.* 2010;86(2):222-228. doi:10.1016/j.ajhg.2009.12.015

158. Tachibana A, Kato T, Ejima Y, et al. The FANCA gene in Japanese Fanconi anemia: reports of eight novel mutations and analysis of sequence variability. *Hum Mutat.* 1999;13(3):237-244. doi:10.1002/(SICI)1098-1004(1999)13:3<237::AID-HUMU8>3.0.CO;2-F
159. Savino M, Ianzano L, Strippoli P, et al. Mutations of the Fanconi anemia group A gene (FAA) in Italian patients. *Am J Hum Genet.* 1997;61(6):1246-1253. doi:10.1086/301632
160. Callén E, Casado JA, Tischkowitz MD, et al. A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood.* 2005;105(5):1946-1949. doi:10.1182/blood-2004-07-2588
161. FA mutation database. <http://www2.rockefeller.edu/fanconi/>.
162. Chandra S, Levran O, Jurickova I, et al. A rapid method for retrovirus-mediated identification of complementation groups in Fanconi anemia patients. *Mol Ther.* 2005;12(5):976-984. doi:10.1016/j.ymthe.2005.04.021
163. Wijker M, Morgan N V, Herterich S, et al. Heterogeneous spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group A gene. *Eur J Hum Genet.* 1999;7(1):52-59. doi:10.1038/sj.ejhg.5200248
164. Ameziane N, Errami A, Léveillé F, et al. Genetic subtyping of Fanconi anemia by comprehensive mutation screening. *Hum Mutat.* 2008;29(1):159-166. doi:10.1002/humu.20625
165. Auerbach AD, Greenbaum J, Pujara K, et al. Spectrum of sequence variation in the FANCG gene: an International Fanconi Anemia Registry (IFAR) study. *Hum Mutat.* 2003;21(2):158-168. doi:10.1002/humu.10166
166. Carrillo J, Martínez P, Solera J, et al. High resolution melting analysis for the identification of novel mutations in DKC1 and TERT genes in patients with dyskeratosis congenita. *Blood Cells Mol Dis.* 49(3-4):140-146. doi:10.1016/j.bcmd.2012.05.008
167. Knight SW, Heiss NS, Vulliamy TJ, et al. X-linked dyskeratosis congenita is predominantly caused by missense mutations in the DKC1 gene. *Am J Hum Genet.* 1999;65(1):50-58. doi:10.1086/302446
168. Walne AJ, Vulliamy T, Kirwan M, Plagnol V, Dokal I. Constitutional mutations in RTEL1 cause severe dyskeratosis congenita. *Am J Hum Genet.* 2013;92(3):448-453. doi:10.1016/j.ajhg.2013.02.001

169. Kannengiesser C, Borie R, Ménard C, et al. Heterozygous RTEL1 mutations are associated with familial pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2015;46(2):474-485. doi:10.1183/09031936.00040115
170. Du H-Y, Pumbo E, Ivanovich J, et al. TERC and TERT gene mutations in patients with bone marrow failure and the significance of telomere length measurements. *Blood*. 2009;113(2):309-316. doi:10.1182/blood-2008-07-166421
171. Pecci A, Panza E, Pujol-Moix N, et al. Position of nonmuscle myosin heavy chain IIA (NMMHC-IIA) mutations predicts the natural history of MYH9-related disease. *Hum Mutat*. 2008;29(3):409-417. doi:10.1002/humu.20661
172. Savoia A, De Rocco D, Panza E, et al. Heavy chain myosin 9-related disease (MYH9 - RD): neutrophil inclusions of myosin-9 as a pathognomonic sign of the disorder. *Thromb Haemost*. 2010;103(4):826-832. doi:10.1160/TH09-08-0593
173. Da Costa L, Tchernia G, Gascard P, et al. Nucleolar localization of RPS19 protein in normal cells and mislocalization due to mutations in the nucleolar localization signals in 2 Diamond-Blackfan anemia patients: potential insights into pathophysiology. *Blood*. 2003;101(12):5039-5045. doi:10.1182/blood-2002-12-3878
174. Albers CA, Paul DS, Schulze H, et al. Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome. *Nat Genet*. 2012;44(4):435-439, S1-2. doi:10.1038/ng.1083
175. Rosenthal EA, Makaryan V, Burt AA, et al. Association Between Absolute Neutrophil Count and Variation at TCIRG1: The NHLBI Exome Sequencing Project. *Genet Epidemiol*. 2016;40(6):470-474. doi:10.1002/gepi.21976
176. Boztug K, Järvinen PM, Salzer E, et al. JAGN1 deficiency causes aberrant myeloid cell homeostasis and congenital neutropenia. *Nat Genet*. 2014;46(9):1021-1027. doi:10.1038/ng.3069
177. Dale DC, Person RE, Bolyard AA, et al. Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. *Blood*. 2000;96(7):2317-2322. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11001877>.
178. Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(18):7552-7557. doi:10.1073/pnas.0701009104

179. Lamm N, Ordan E, Shponkin R, Richler C, Aker M, Tzfati Y. Diminished telomeric 3' overhangs are associated with telomere dysfunction in Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *PLoS One*. 2009;4(5):e5666. doi:10.1371/journal.pone.0005666
180. Mirzaei H, Schmidt KH. Non-Bloom syndrome-associated partial and total loss-of-function variants of BLM helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(47):19357-19362. doi:10.1073/pnas.1210304109
181. Ellis NA, Proytcheva M, Sanz MM, Ye TZ, German J. Transfection of BLM into cultured bloom syndrome cells reduces the sister-chromatid exchange rate toward normal. *Am J Hum Genet*. 1999;65(5):1368-1374. doi:10.1086/302616
182. Ellis NA, Groden J, Ye TZ, et al. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell*. 1995;83(4):655-666.
183. Drouin CA, Mongrain E, Sasseville D, Bouchard HL, Drouin M. Rothmund-Thomson syndrome with osteosarcoma. *J Am Acad Dermatol*. 1993;28(2 Pt 2):301-305. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8436644>.
184. Simon T, Kohlhase J, Wilhelm C, Kochanek M, De Carolis B, Berthold F. Multiple malignant diseases in a patient with Rothmund-Thomson syndrome with RECQL4 mutations: Case report and literature review. *Am J Med Genet A*. 2010;152A(6):1575-1579. doi:10.1002/ajmg.a.33427
185. De Rocco D, Bottega R, Cappelli E, et al. Molecular analysis of Fanconi anemia: The experience of the bone marrow failure study group of the Italian Association of Pediatric Onco-Hematology. *Haematologica*. 2014;99(6):1022-1031. doi:10.3324/haematol.2014.104224
186. Ameziane N, Sie D, Dentro S, et al. Diagnosis of fanconi anemia: Mutation analysis by next-generation sequencing. *Anemia*. 2012;2012. doi:10.1155/2012/132856
187. Gerrard G, Valgañón M, Foong HE, et al. Target enrichment and high-throughput sequencing of 80 ribosomal protein genes to identify mutations associated with Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 2013;162(4):530-536. doi:10.1111/bjh.12397
188. Stewart DR, Pemov A, Johnston JJ, et al. Dubowitz syndrome is a complex comprised of multiple, genetically distinct and phenotypically overlapping disorders. *PLoS One*. 2014;9(6):e98686. doi:10.1371/journal.pone.0098686
189. Niihori T, Ouchi-Uchiyama M, Sasahara Y, et al. Mutations in MECOM, Encoding

- Oncoprotein EVI1, Cause Radioulnar Synostosis with Amegakaryocytic Thrombocytopenia. *Am J Hum Genet.* 2015;97(6):848-854. doi:10.1016/j.ajhg.2015.10.010
190. Tummala H, Kirwan M, Walne AJ, et al. ERCC6L2 mutations link a distinct bone-marrow-failure syndrome to DNA repair and mitochondrial function. *Am J Hum Genet.* 2014;94(2):246-256. doi:10.1016/j.ajhg.2014.01.007
191. Beghini A, Castorina P, Roversi G, Modiano P, Larizza L. RNA processing defects of the helicase gene RECQL4 in a compound heterozygous Rothmund-Thomson patient. *Am J Med Genet A.* 2003;120A(3):395-399. doi:10.1002/ajmg.a.20154
192. Townsley DM, Dumitriu B, Young NS. Bone marrow failure and the telomeropathies
Running title : Correspondence to : 2014;124(18):2775-2784. doi:10.1182/blood-2014-05-526285
193. Armanios M, Chen J-L, Chang Y-PC, et al. Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(44):15960-15964. doi:10.1073/pnas.0508124102
194. Vulliamy T, Marrone A, Szydlo R, Walne A, Mason PJ, Dokal I. Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC. *Nat Genet.* 2004;36(5):447-449. doi:10.1038/ng1346
195. Kajtár P, Méhes K. Bilateral coats retinopathy associated with aplastic anaemia and mild dyskeratotic signs. *Am J Med Genet.* 1994;49(4):374-377. doi:10.1002/ajmg.1320490404
196. Gayatri NA, Hughes MI, Lloyd IC, Wynn RF. Association of the congenital bone marrow failure syndromes with retinopathy, intracerebral calcification and progressive neurological impairment. *Eur J Paediatr Neurol.* 2002;6(2):125-128. doi:10.1053/ejpn.2001.0559
197. Tsilou ET, Giri N, Weinstein S, Mueller C, Savage SA, Alter BP. Ocular and orbital manifestations of the inherited bone marrow failure syndromes: Fanconi anemia and dyskeratosis congenita. *Ophthalmology.* 2010;117(3):615-622. doi:10.1016/j.optha.2009.08.023
198. Savage SA, Giri N, Baerlocher GM, Orr N, Lansdorp PM, Alter BP. TINF2, a component of the shelterin telomere protection complex, is mutated in dyskeratosis congenita. *Am J Hum Genet.* 2008;82(2):501-509. doi:10.1016/j.ajhg.2007.10.004

199. Revesz T, Fletcher S, Al-Gazali LI, DeBuse P. Bilateral retinopathy, aplastic anaemia, and central nervous system abnormalities: a new syndrome? *J Med Genet.* 1992;29(9):673-675. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1404302>.
200. Manuscript A, Retinopathy E. NIH Public Access. 2014;61(12):2302-2304. doi:10.1002/pbc.25161.Dyskeratosis
201. Ihara K, Ishii E, Eguchi M, et al. Identification of mutations in the c-mpl gene in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(6):3132-3136.
202. Arbiv OA, Cuvelier G, Klaassen RJ, et al. Molecular analysis and genotype-phenotype correlation of Diamond-Blackfan anemia. *Clin Genet.* 2018;93(2):320-328. doi:10.1111/cge.13158
203. Smetanina NS, Mersiyanova I V, Kurnikova MA, et al. Clinical and genomic heterogeneity of Diamond Blackfan anemia in the Russian Federation. *Pediatr Blood Cancer.* 2015;62(9):1597-1600. doi:10.1002/pbc.25534
204. van Dooijeweert B, van Ommen CH, Smiers FJ, et al. Pediatric Diamond-Blackfan anemia in the Netherlands: An overview of clinical characteristics and underlying molecular defects. *Eur J Haematol.* 2018;100(2):163-170. doi:10.1111/ejh.12995
205. Wan Y, Chen X, An W, et al. Clinical features, mutations and treatment of 104 patients of Diamond-Blackfan anemia in China: a single-center retrospective study. *Int J Hematol.* 2016;104(4):430-439. doi:10.1007/s12185-016-2044-9
206. Quarello P, Garelli E, Carando A, et al. Diamond-Blackfan anemia: genotype-phenotype correlations in Italian patients with RPL5 and RPL11 mutations. *Haematologica.* 2010;95(2):206-213. doi:10.3324/haematol.2009.011783
207. Delaporta P, Sofocleous C, Stiakaki E, et al. Clinical phenotype and genetic analysis of RPS19, RPL5, and RPL11 genes in Greek patients with Diamond Blackfan Anemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61(12):2249-2255. doi:10.1002/pbc.25183
208. Arbiv OA, Cuvelier G, Klaassen RJ, et al. Molecular analysis and genotype-phenotype correlation of Diamond-Blackfan anemia. *Clin Genet.* 2018;93(2):320-328. doi:10.1111/cge.13158
209. Delaporta P, Sofocleous C, Stiakaki E, et al. Clinical phenotype and genetic analysis of RPS19, RPL5, and RPL11 genes in Greek patients with Diamond Blackfan Anemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61(12):2249-2255. doi:10.1002/pbc.25183

210. Quarello P, Garelli E, Carando A, et al. Diamond-Blackfan anemia: genotype-phenotype correlations in Italian patients with RPL5 and RPL11 mutations. *Haematologica*. 2010;95(2):206-213. doi:10.3324/haematol.2009.011783
211. Konno Y, Toki T, Tandai S, et al. Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica*. 2010;95(8):1293-1299. doi:10.3324/haematol.2009.020826
212. <http://www.rockefeller.edu/fanconi/>.
213. Castella M, Pujol R, Callén E, et al. Origin, functional role, and clinical impact of Fanconi anemia FANCA mutations. *Blood*. 2011;117(14):3759-3769. doi:10.1182/blood-2010-08-299917
214. Casado JA, Callén E, Jacome A, et al. A comprehensive strategy for the subtyping of patients with Fanconi anaemia: Conclusions from the Spanish Fanconi Anemia Research Network. *J Med Genet*. 2007;44(4):241-249. doi:10.1136/jmg.2006.044719
215. Dokal I, Chase A, Morgan N V, et al. Positive diepoxybutane test in only one of two brothers found to be compound heterozygotes for Fanconi's anaemia complementation group C mutations. *Br J Haematol*. 1996;93(4):813-816. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8703809>.
216. Grasso C, Butler T, Rhodes K, et al. Assessing copy number alterations in targeted, amplicon-based next-generation sequencing data. *J Mol Diagnostics*. 2015;17(1):53-63. doi:10.1016/j.jmoldx.2014.09.008
217. Nicchia E, Greco C, De Rocco D, et al. Identification of point mutations and large intragenic deletions in Fanconi anemia using next-generation sequencing technology. *Mol Genet Genomic Med*. 2015;3(6):500-512. doi:10.1002/mgg3.160
218. Alter BP, Rosenberg PS, Giri N, Baerlocher GM, Lansdorp PM, Savage SA. Telomere length is associated with disease severity and declines with age in dyskeratosis congenita. *Haematologica*. 2012;97(3):353-359. doi:10.3324/haematol.2011.055269
219. Armanios M. Syndromes of telomere shortening. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2009;10:45-61. doi:10.1146/annurev-genom-082908-150046
220. Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*. 2001;107(1):67-77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11595186>.


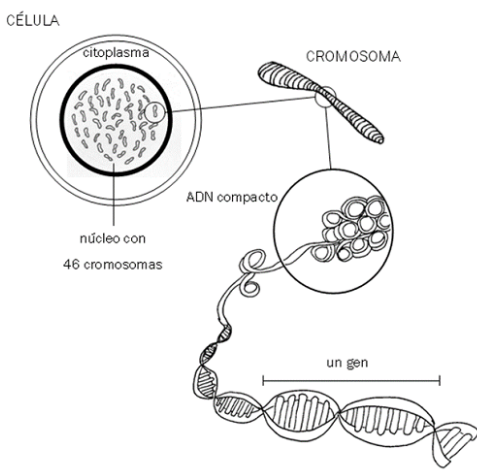
221. Letsolo BT, Rowson J, Baird DM. Fusion of short telomeres in human cells is characterized by extensive deletion and microhomology, and can result in complex rearrangements. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(6):1841-1852. doi:10.1093/nar/gkp1183
222. Lin TT, Letsolo BT, Jones RE, et al. Telomere dysfunction and fusion during the progression of chronic lymphocytic leukemia: evidence for a telomere crisis. *Blood.* 2010;116(11):1899-1907. doi:10.1182/blood-2010-02-272104
223. Walne AJ, Vulliamy T, Beswick R, Kirwan M, Dokal I. TINF2 mutations result in very short telomeres: analysis of a large cohort of patients with dyskeratosis congenita and related bone marrow failure syndromes. *Blood.* 2008;112(9):3594-3600. doi:10.1182/blood-2008-05-153445
224. Vulliamy TJ, Kirwan MJ, Beswick R, et al. Differences in disease severity but similar telomere lengths in genetic subgroups of patients with telomerase and shelterin mutations. *PLoS One.* 2011;6(9). doi:10.1371/journal.pone.0024383
225. Houben JMJ, Moonen HJJ, van Schooten FJ, Hageman GJ. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med.* 2008;44(3):235-246. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.10.001
226. Pavesi E, Avondo F, Aspesi A, et al. Analysis of telomeres in peripheral blood cells from patients with bone marrow failure. *Pediatr Blood Cancer.* 2009;53(3):411-416. doi:10.1002/pbc.22107
227. Li X, Leteurtre F, Rocha V, et al. Abnormal telomere metabolism in Fanconi's anaemia correlates with genomic instability and the probability of developing severe aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 2003;120(5):836-845. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12614219>.
228. Thornley I, Dror Y, Sung L, Wynn RF, Freedman MH. Abnormal telomere shortening in leucocytes of children with Shwachman-Diamond syndrome. *Br J Haematol.* 2002;117(1):189-192. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11918553>.
229. Walne AJ, Collopy L, Cardoso S, et al. Marked overlap of four genetic syndromes with dyskeratosis congenita confounds clinical diagnosis. *Haematologica.* 2016;101(10):1180-1189. doi:10.3324/haematol.2016.147769
230. Hsieh MM, Everhart JE, Byrd-Holt DD, Tisdale JF, Rodgers GP. Prevalence of neutropenia in the U.S. population: age, sex, smoking status, and ethnic differences. *Ann*

- Intern Med.* 2007;146(7):486-492. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17404350>.
231. Ancliff PJ, Gale RE, Liesner R, Hann IM, Linch DC. Mutations in the ELA2 gene encoding neutrophil elastase are present in most patients with sporadic severe congenital neutropenia but only in some patients with the familial form of the disease. *Blood.* 2001;98(9):2645-2650. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11675333>.
 232. Sobacchi C, Schulz A, Coxon FP, Villa A, Helfrich MH. Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9(9):522-536. doi:10.1038/nrendo.2013.137
 233. Makaryan V, Rosenthal EA, Bolyard AA, et al. TCIRG1-Associated Congenital Neutropenia. *Hum Mutat.* 2014;35(7):824-827. doi:10.1002/humu.22563
 234. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest.* 2010;120(7):2423-2431. doi:10.1172/JCI41649
 235. Noris P, Biino G, Pecci A, et al. Platelet diameters in inherited thrombocytopenias: Analysis of 376 patients with all known disorders. *Blood.* 2014;124(6):4-11. doi:10.1182/blood-2014-03-564328
 236. Balduini CL, Noris P. Innovation in the field of thrombocytopenias: Achievements since the beginning of the century and promises for the future. *Haematologica.* 2016;101(1):2-4. doi:10.3324/haematol.2015.138149
 237. Pecci A, Klersy C, Gresele P, et al. MYH9-related disease: a novel prognostic model to predict the clinical evolution of the disease based on genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat.* 2014;35(2):236-247. doi:10.1002/humu.22476
 238. Simeoni I, Stephens JC, Hu F, et al. A high-throughput sequencing test for diagnosing inherited bleeding, thrombotic, and platelet disorders. *Blood.* 2016;127(23):2791-2803. doi:10.1182/blood-2015-12-688267
 239. Favier R, Raslova H. Progress in understanding the diagnosis and molecular genetics of macrothrombocytopenias. *Br J Haematol.* 2015;170(5):626-639. doi:10.1111/bjh.13478
 240. Noris P, Favier R, Alessi M-C, et al. ANKRD26-related thrombocytopenia and myeloid malignancies. *Blood.* 2013;122(11):1987-1989. doi:10.1182/blood-2013-04-499319
 241. Noetzli L, Lo RW, Lee-Sherick AB, et al. Germline mutations in ETV6 are associated with thrombocytopenia, red cell macrocytosis and predisposition to lymphoblastic

- leukemia. *Nat Genet.* 2015;47(5):535-538. doi:10.1038/ng.3253
242. Nicchia E, Giordano P, Greco C, De Rocco D, Savoia A. Molecular diagnosis of thrombocytopenia-absent radius syndrome using next-generation sequencing. *Int J Lab Hematol.* 2016;38(4):412-418. doi:10.1111/ijlh.12516
243. Westbury SK, Mumford AD. Genomics of platelet disorders. *Haemophilia.* 2016;22:20-24. doi:10.1111/hae.12964
244. Wang R, Yoshida K, Toki T, et al. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol.* 2015;168(6):854-864. doi:10.1111/bjh.13229
245. Nagata Y, Narumi S, Guan Y, et al. Germline loss of function SAMD9 and SAMD9L alterations in adult myelodysplastic syndromes. *Blood.* October 2018. doi:10.1182/blood-2017-05-787390

9. ANEXOS

9.1 Anexo I: Consentimiento informado estudio NGS

 <p>Hospital Universitario La Paz Hospital de Cantoblanco Hospital Carlos III Comunidad de Madrid</p> <p>Paseo de la Castellana, 261 28046 MADRID ☎ 91 727 70 00</p>	<p align="center">ETIQUETA (EN SU DEFECTO, INDIQUE NOMBRE Y UBICACIÓN DEL PACIENTE)</p> <p>NOMBRE:</p> <p>PROCEDENCIA(CAMA) : NHC :</p> <p>FECHA :/...../..... GÉNERO :</p>
<p align="center">CONSENTIMIENTO INFORMADO IDENTIFICACIÓN: C-GEN-007</p>	<p align="center">SECCIÓN DE GENÉTICA CLÍNICA. INSTITUTO DE GENÉTICA MÉDICA Y MOLECULAR (INGEMM)</p>
<p align="center">PROCEDIMIENTO: ESTUDIO GENÉTICO MEDIANTE TÉCNICA DE SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS)</p>	
<p align="center">¿QUÉ LE VAMOS A HACER?</p>	
<p>1. Descripción del procedimiento</p> <ul style="list-style-type: none"> • En qué consiste la secuenciación masiva <p>La secuenciación masiva es una nueva modalidad de estudio genético. Este consentimiento informado explica los siguientes aspectos de la secuenciación masiva:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ ¿Qué son los cromosomas y los genes? ➤ ¿Cuál es la utilidad de la secuenciación masiva? ➤ ¿Qué genes se estudian? ➤ ¿Qué limitaciones tiene esta técnica? ➤ ¿Cuáles son los posibles resultados de un estudio de secuenciación masiva? ➤ ¿Qué hallazgos se informan y cuáles no? ➤ La necesidad de revisar los resultados de los estudios de secuenciación masiva según avance el conocimiento en genética ➤ ¿Qué se necesita para realizar un estudio de secuenciación masiva? ➤ La utilización de los resultados de la secuenciación masiva en investigación ➤ Datos de contacto para ampliar la información <p>➤ <u>¿Qué son los cromosomas y los genes?</u></p> <p>Toda la información genética está almacenada en cada célula de nuestro cuerpo. El material genético que contiene esta información es el ADN, comprimido y empaquetado en forma de estructuras alargadas visibles al microscopio llamadas cromosomas. Los genes son fragmentos de la cadena de ADN con instrucciones específicas para la producción de diferentes proteínas que controlan el desarrollo y el funcionamiento de nuestro organismo. Cada célula de nuestro cuerpo contiene 46 cromosomas, agrupados en 23 pares. Un par procede de nuestra madre y el otro de nuestro padre. Los cromosomas, por un acuerdo internacional, se numeran del 1 al 22, del más grande al más pequeño. El par restante está formado por los cromosomas X e Y, que determinan el sexo de una persona: las mujeres tienen dos copias del cromosoma X (46,XX) y los hombres tienen una de cada (46,XY).</p>  <p align="right">07.00</p>	

Cada cromosoma contiene varios cientos o algunos miles de genes (entre 700 y 3.000). Se estima que los 24 cromosomas (1-22, X e Y) contienen unos 22.000 genes. Cada gen, a su vez, está compuesto por fragmentos de la secuencia de ADN, llamados **exones**, que contienen la información necesaria para la síntesis de una proteína. Estos se intercalan con otros fragmentos llamados intrones, con distinta función y que no contienen información genética (algo parecido a la siguiente frase, en la que los exones estarían representados en negrita: "bb**inf**bbcc**orm**ccbb**ación**gbbcc**en**éccbb**tic**acc"). La totalidad del ADN contenido en los 46 cromosomas se conoce como el **genoma**. La información codificante del genoma (la información contenida en la secuencia de los exones de los genes) se conoce como **exoma**. El exoma supone entre 1-2% del genoma y contiene el 85% de las mutaciones causantes de enfermedades y trastornos genéticos.

Cada uno de los genes tiene una función específica, aunque esta no se conozca en muchos casos. Una enfermedad o un trastorno genético puede deberse a que uno o más genes estén alterados. Esto puede suceder bien porque falte o sobre un fragmento del gen o bien porque se produzca un cambio que altere la secuencia de ADN y la proteína correspondiente que codifica ese gen.

- Una *alteración que afecta la función de un gen*, lo que se conoce como **mutación**, puede heredarse de uno o ambos progenitores, o producirse por primera vez en el óvulo o en el espermatozoide que da lugar a esa persona.
- Una *alteración que no afecta a la función del gen, o cuya posible afectación no se puede confirmar con seguridad*, lo que se conoce como **variante**, puede ser benigna o de significado incierto, respectivamente, y también puede heredarse de un progenitor o producirse por primera vez en una persona.

➤ ¿Cuál es la utilidad de la secuenciación masiva?

Hasta hace poco, los estudios genéticos consistían básicamente en determinar *de forma sucesiva, uno a uno*, la secuencia de ADN de uno o de varios genes causantes de una enfermedad o de un trastorno genético. La **secuenciación masiva**, como su propio nombre indica, permite determinar *de forma simultánea* la secuencia de ADN de un número variable de genes. Esto resulta particularmente útil en aquellas enfermedades o trastornos genéticos causados por múltiples y diferentes genes (por ejemplo, se conocen más de 50 genes diferentes causantes de retinosis pigmentaria, una enfermedad de la retina). Para situaciones en las que no se dispone de una orientación clínica concreta, la secuenciación masiva resulta idónea, porque ofrece la posibilidad de estudiar la totalidad de los 22.000 genes, mediante la secuenciación del exoma, con el fin de intentar identificar la posible causa de la enfermedad o del trastorno genético.

El término **secuenciación de última generación** (del inglés *next generation sequencing*, NGS) es sinónimo y equivalente al de secuenciación masiva en castellano.

➤ ¿Qué genes se estudian?

En la mayoría de los casos el estudio se limita inicialmente al análisis de un grupo o **panel de genes** relacionados con la enfermedad o el trastorno genético que ha motivado el estudio. En el caso de no identificar ninguna alteración, si existe indicación médica, es posible ampliar el estudio a otros genes, pudiendo llegar al exoma completo, si el paciente lo autoriza.

En determinados casos en los que no se disponga de una orientación diagnóstica específica es posible que se opte desde un principio por analizar el exoma completo (**secuenciación del exoma**). La estrategia idónea dependerá de cada caso y se explicará con detalle antes de iniciar el estudio.

En cualquier caso, y a pesar de la exhaustividad de estos estudios, **es posible que no se logre encontrar la causa** de la enfermedad o del trastorno genético, ya que la sensibilidad de estas pruebas no es del 100%.

➤ ¿Qué limitaciones tiene esta técnica?

Los estudios de secuenciación masiva generan una gran cantidad de datos y es preciso distinguir los que puedan ser relevantes de los que puedan no serlo. Existen además ciertas limitaciones técnicas que conviene conocer para interpretar los resultados con precisión:

- Existen ciertas regiones en los genes que pueden resultar difíciles de analizar. Si esto sucediera en el análisis, se indicaría en el informe.
- Si el estudio se limita al análisis de un grupo o panel de genes, únicamente se podrán detectar mutaciones en estos genes. Por tanto, mutaciones de interés en otros genes no incluidos en el panel no van a ser detectadas. El informe incluirá la lista exacta de genes analizados, así como el diseño de panel específico empleado para el estudio.

➤ ¿Cuáles son los posibles resultados de un estudio de secuenciación masiva?

Nos podemos encontrar ante cuatro situaciones posibles:

- 1) *Que se detecte una o más alteraciones considerada/s como causante/s de la enfermedad o del trastorno genético* que indicó el estudio, lo que confirmaría o aclararía el diagnóstico. En esta situación, se comentará con el paciente el alcance y las implicaciones del resultado.
- 2) *Que se detecte una o más alteraciones **de significado incierto***. En este caso puede ser necesario solicitar exploraciones complementarias o estudiar a otros miembros de la familia con el fin de intentar confirmar si los hallazgos se relacionan o no con la enfermedad o el trastorno genético que motivó el estudio.
- 3) *Que no se detecten alteraciones* que puedan explicar la enfermedad o el trastorno genético.
- 4) *Que, en el caso de que se analicen todos los genes (secuenciación del exoma), se detecten **hallazgos incidentales o fortuitos***¹. Estos se definen como alteraciones detectadas de forma casual, no relacionadas con la enfermedad o el trastorno genético que indicó el estudio, pero que pueden tener implicaciones relevantes para la salud del paciente y/o de sus familiares.

➤ ¿Qué hallazgos se informan al paciente y cuáles no?

Se informan:

- Hallazgos causantes o relacionados con la enfermedad o el trastorno genético que indicó el estudio.
- **Si el paciente o el tutor legal lo solicita y lo autoriza**, hallazgos incidentales o fortuitos no relacionados con la enfermedad o el trastorno genético que indicó el estudio pero que pudieran tener consecuencias importantes para la salud del paciente o de sus familiares (por ejemplo, mutaciones en genes causantes de enfermedades cardiovasculares que predisponen a muerte súbita y en genes que predisponen al desarrollo de cáncer hereditario).

No se informan:

- Hallazgos de significado incierto sin relación causal aparente con el motivo del estudio.
- Hallazgos que confirman la condición de portador (sano) de una mutación causante de una enfermedad o trastorno genético (por ejemplo, la fibrosis quística del páncreas).

➤ La necesidad de revisar los resultados de los estudios de secuenciación masiva según avance el conocimiento en genética

El conocimiento sobre la función de los genes y su papel en determinadas enfermedades y trastornos genéticos avanza de forma rápida y progresiva. Una alteración genética identificada y considerada de significado incierto en la actualidad, deberá ser revisada más adelante. Por ello, en estos casos, se recomienda que, pasado un tiempo (uno o dos años), se acuda de nuevo a consulta para revisar la situación y comprobar si se dispone de nueva información que pudiera modificar la interpretación inicial del hallazgo.

- **Cómo se realiza este procedimiento:** Es necesaria una muestra de sangre (3-6 ml) o de cualquier otro tejido del que se pueda obtener ADN. La muestra de sangre se obtiene mediante una extracción sanguínea a través de una punción de una vena de la parte interior del codo o del dorso de la mano. La extracción se realizará habitualmente en el servicio de Análisis Clínico-Extracciones del hospital. No es necesario acudir en ayunas. La muestra se procesará en los laboratorios de genética del hospital.
Una vez obtenida la muestra, se procede a extraer el ADN de las células (en una muestra de sangre, los leucocitos o glóbulos blancos), parte del cual se utiliza para realizar el estudio y el resto se almacena por si hubiera que repetirlo. En algunos casos puede ser necesario obtener una muestra de sangre de los padres o de otros familiares para poder interpretar los resultados.
- **Cuánto dura:** La extracción dura entre 5 y 10 minutos. El plazo estimado de resultados es variable, alrededor de 6 meses, dependiendo de la amplitud del estudio.

2. Qué objetivos persigue: Identificar la alteración genética causante de la enfermedad o del trastorno genético.

¹ También conocidos como hallazgos casuales, coincidentes, imprevistos, inesperados, no solicitados, circunstanciales, accidentales, secundarios, complementarios, no deliberados, etc.

¿QUÉ RIESGOS TIENE?
<p>1. Riesgos generales:</p> <p>Los riesgos asociados con la punción venosa son leves e infrecuentes (hematoma en el punto de punción, desmayo o sensación de mareo).</p> <p>2. Riesgos personalizados:</p> <p>Además de los riesgos anteriormente citados por la/s enfermedad/es que padece puede presentar otras complicaciones.....</p> <p>3. Beneficios del procedimiento a corto y medio plazo:</p> <p>Identificar la alteración genética causante de una enfermedad o de un trastorno genético no solamente permite confirmar el diagnóstico, sino que también puede aportar información sobre el pronóstico y posibilitar el diagnóstico prenatal y el estudio de otros miembros de la familia.</p>
¿QUÉ OTRAS ALTERNATIVAS HAY?
<p>No hay otras alternativas.</p>
¿NOS AUTORIZA?
<p>Por este documento solicitamos de forma general la autorización para realizar el procedimiento y/o prueba mencionados, y para usar imágenes e información de la Historia Clínica con fines docentes o científicos, ya que está siendo atendido en un Hospital Universitario. El anonimato será respetado.</p> <p>Toda la información relacionada con el estudio es estrictamente confidencial y será tratada en conformidad con la Ley Orgánica de Protección de Datos 15/1999 y los derechos conlleva de acceso, cancelación, rectificación y oposición.</p> <p>En caso de obtener su autorización, los resultados de los estudios de secuenciación masiva serán conservados y custodiados en el INGEMM y podrán ser compartidos, de forma anónima sin identificadores personales, con otros grupos de investigación con el fin de aumentar el conocimiento sobre las enfermedades genéticas.</p>
DECLARACIONES Y FIRMAS
<p>Antes de firmar este documento, si desea más información o tiene cualquier duda sobre este procedimiento, no tenga reparo en preguntarnos. Le atenderemos con mucho gusto. Le informamos que tiene derecho a revocar su decisión y retirar su consentimiento, solicitándolo por escrito.</p> <p>Declaro mi conformidad con los puntos siguientes</p> <p><u>Con respecto al alcance de la prueba y a la información de los hallazgos:</u></p> <p>Deseo que el ADN extraído de mí / mi hijo / la persona bajo mi tutela legal sea analizado mediante técnicas de secuenciación masiva para el siguiente problema médico, y que se realice el siguiente tipo de análisis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Problema médico: • Tipo de análisis: <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Opción 1: <u>Análisis de grupo o panel de genes</u> Análisis exclusivamente de los genes conocidos y relacionados con la enfermedad o el trastorno genético <input type="checkbox"/> Opción 2: <u>Análisis ampliado</u> Análisis de los genes conocidos y relacionados con la enfermedad o el trastorno genético, seguido de un análisis ampliado de otros genes, pudiendo llegar al exoma completo, si existe indicación médica <p>Entiendo que en cualquiera de las dos opciones es posible encontrar hallazgos de significado incierto.</p> <p>Si he optado por la opción 2 (análisis ampliado), entiendo que existe además la posibilidad de encontrar hallazgos incidentales o fortuitos no relacionados con la enfermedad o el trastorno genético que ha indicado el estudio.</p> <p><input type="checkbox"/> Deseo / <input type="checkbox"/> No deseo ser informado de los hallazgos incidentales o fortuitos que se puedan detectar y que pudieran tener consecuencias importantes para mi salud o la de mis familiares. Específicamente, los que afecten a los genes que tienen relevancia clínica.</p>
07.00

Con relación a la posible utilización de la muestra de ADN:

- ☐ Deseo / ☐ No deseo que la muestra de ADN se destruya una vez realizado el estudio
- ☐ Deseo / ☐ No deseo que el excedente de la muestra de ADN quede conservada y custodiada en el INGEMM
- ☐ Autorizo / ☐ No autorizo a que la muestra de ADN conservada en el INGEMM pueda ser compartida de forma anónima con otros grupos que investiguen sobre la misma enfermedad o trastorno genético
- ☐ Autorizo/ ☐ No autorizo a que parte de la muestra de ADN conservada en el INGEMM sea utilizada de forma anónima en el proceso de desarrollo y homologación de estas pruebas genéticas

Entiendo que el conocimiento médico avanza con el paso del tiempo y que sería conveniente acudir de nuevo a consulta más adelante para revisar la situación y comprobar si se dispone de nueva información que pudiera modificar la interpretación inicial de los resultados.

1. Firma del/la paciente:

D./D.^a con D.N.I.

He sido informado/a suficientemente de la intervención que se me va a realizar, y me han explicado los riesgos, complicaciones y alternativas posibles; lo he comprendido y he tenido el tiempo suficiente para valorar mi decisión. Por tanto, estoy satisfecho/a con la información recibida. Por ello, doy mi consentimiento para que se realice dicha prueba por el médico responsable y/o médico residente supervisado por facultativo especialista y a ser informado/a de los resultados según lo arriba dispuesto. Mi aceptación es voluntaria y puedo retirar este consentimiento cuando lo crea oportuno, solicitándolo por escrito, sin que esta decisión repercuta en mis cuidados posteriores.

Firma del paciente

Fecha: / /

2. Firma de familiar o tutores

El paciente D./Dña. no tiene capacidad para decidir en este momento. D. /D^a. con D.N.I. y en calidad de....., he sido informado/a suficientemente de la intervención que se le va a realizar. Por ello, doy expresamente mi consentimiento. Mi aceptación es voluntaria y puedo retirar este consentimiento cuando lo crea oportuno.

Firma del tutor o familiar

Fecha: / /

3. Relativo al médico que solicita:

Dr./Dra. he informado al paciente y/o al tutor o familiar del objeto y naturaleza del procedimiento que se le va a realizar explicándole los riesgos, complicaciones y alternativas posibles.

Firma del médico

Fecha: / /

4. Relativo a la no aceptación (REVOCACIÓN) del Consentimiento Informado:

D./Dña. con D.N.I.

He sido informado de que puedo revocar este documento previamente a la realización de la intervención, por lo que manifiesto que **NO** doy mi Consentimiento para someterme a la realización de la misma, dejando sin efecto mi Consentimiento anterior. Deseo hacer las siguientes observaciones

Firma del paciente

Fecha: / /

07.00

5. Relativo a la RENUNCIA al Derecho de Información:

D./Dña.: con D.N.I.

Pongo de manifiesto que, por razones personales, **renuncio** al derecho de información que me corresponde como paciente y expreso mi deseo de **no recibir información**, en el momento actual, sobre el proceso de mi enfermedad sin que ello implique que no pueda dar mi consentimiento para someterme a la realización de esta intervención, tal como he prestado y firmado en el apartado 1.

Firma del paciente

Fecha://

07.00

9.2 Anexo II: Consentimiento informado biobanco



EJEMPLAR PARA EL DONANTE

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PARA LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA INVESTIGACIÓN OBTENIDAS EN EL CURSO DE PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS, TERAPÉUTICOS O DIAGNÓSTICOS

1. IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Durante la intervención quirúrgica o la prueba diagnóstica a la que va a ser sometido se tomarán muestras de sus tejidos y/o de sangre. El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente cualquier muestra biológica sobrante de la intervención o prueba a la que va a ser sometido a un biobanco de muestras biológicas, sin que ello suponga ningún riesgo añadido para su salud ni comprometa el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad. Dichas muestras biológicas excedentes podrán ser utilizadas en proyectos de investigación biomédica.

Si lo autoriza, también se le tomará un volumen relativamente pequeño de sangre para su almacenamiento en el biobanco y posible uso en investigación.

Las muestras que done se almacenarán en el **CIBERER-BIOBANK** que forma parte de la Red Valenciana de Biobancos, autorizado por la administración autonómica y que cumple con los requerimientos establecidos en la normativa vigente.

Sus muestras sólo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación avalados científicamente que previamente sean aprobados por los comités externos a los que esté adscrito este biobanco, incluyendo el Comité de Ética para la Investigación y el Comité Científico. En ocasiones dichos estudios se realizarán fuera del centro en el que ha sido tratado/a.

Las muestras seguirán almacenadas en el **CIBERER-BIOBANK** hasta el fin de las existencias si no existe una revocación del presente consentimiento.

2. OBJETIVO

El **CIBERER-BIOBANK**, ubicado en el Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP) de Valencia, es un biobanco constituido con la finalidad de recoger y almacenar muestras biológicas humanas para realizar proyectos de investigación biomédica. Los resultados de dichos proyectos de investigación pueden derivar en el descubrimiento de métodos y medicamentos para el mejor diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades. Tanto las muestras como los datos asociados a las mismas serán custodiados y en su caso cedidos a terceros con fines de investigación biomédica en los términos previstos en la Ley 14/2007, de 3 de julio, y en el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre.

3. BENEFICIOS ESPERADOS

No percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas y éstas no tendrán valor comercial. Sin embargo, si las investigaciones que se pudieran realizar tuvieran éxito, podrían ayudar en el futuro a pacientes que tienen la misma enfermedad o padecen otras enfermedades similares.

La donación implica, la renuncia por parte de los donantes a cualquier derecho de naturaleza económica o de otro tipo sobre los resultados que pudieran derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con las muestras biológicas.

Las muestras de los tejidos y/o sangre no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales pero los costes de conservación y envío se cubrirán sobre una base sin ánimo de lucro.

La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando por razones de salud puedan ser necesarias.

v16-01-2014

CIBERER Biobank, Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) - CIF: G85296226
Centro Superior de Investigación en Salud Pública. Planta Segunda. Avda. de Cataluña, 21 CP 46020 - Tel. 96 348 4380 -
www.ciberer-biobank.es

1

EJEMPLAR PARA EL DONANTE

4. CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE LA DONACIÓN

Sólo si usted lo desea, existe la posibilidad de que pueda ser contactado en el futuro para completar o actualizar la información de la que contamos en este momento y/o de tomar una nueva muestra que pudiera ser interesante en el desarrollo de la investigación biomédica, en cuyo caso volverá a ser informado/a de la situación y tendrá la libertad de participar o declinar dicha participación.

Es posible que los estudios realizados sobre sus muestras aporten información relevante para su salud o la de sus familiares. Tiene derecho tanto a ser informado como a que no se le informe de sus datos genéticos y otros datos personales obtenidos en la investigación. A estos efectos, se entenderá que no desea recibir tal información salvo que manifieste lo contrario, utilizando para ello el formulario que tiene a su disposición en el centro sanitario en el que está siendo atendido.

Estos datos pueden repercutir en algunos miembros de su familia, por lo cual usted valorará la conveniencia de transmitirles dicha información.

En el caso de almacenamiento de muestras de menores de edad, el CIBERER Biobank garantiza el acceso del sujeto fuente a la información relativa a las mismas, una vez éste alcance la mayoría de edad.

5. CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU NO REALIZACIÓN Y DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

La decisión de donar sus muestras es totalmente voluntaria, pudiendo negarse a donarlas e incluso pudiendo revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe.

Si decidiera revocar el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se haya utilizado en la investigación, será destruida o anonimizada. Tales efectos, no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo con anterioridad.

6. RIESGOS

El procedimiento que se le propone no supone ningún riesgo añadido para su salud ni compromete el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad.

La donación de sangre apenas tiene efectos secundarios; lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 ó 2 días.

7. PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD

Sus datos personales y de salud serán incorporados a un Fichero de datos para su tratamiento, de acuerdo con lo estipulado en la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de datos de Carácter Personal, de 13 de diciembre (LOPD), del que es responsable el **CIBERER-BIOBANK**.

La cesión a otros centros de investigación, públicos o privados, de sus muestras de tejidos y/o sangre o de sus derivados, así como de la información contenida en las bases de datos vinculada a las mismas y a su estado de salud, se realizará mediante un procedimiento de codificación y disociación de datos, esto es, desligando la información que le identifica.

Asimismo, el titular de los datos personales podrá ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición al tratamiento de datos de carácter personal, y de revocación del consentimiento (en este último caso, conforme al formulario que tiene a su disposición en el centro sanitario en el que está siendo atendido) en los términos previstos en la normativa aplicable mediante escrito dirigido al CIBERER Biobank (Centro Superior de Investigación en Salud Pública. Planta Segunda. Avenida de Cataluña, 21 CP 46020, Valencia).

8. DESTINO DE LAS MUESTRAS EN CASO DE CIERRE DEL BIOBANCO

De producirse un eventual cierre del CIBERER-BIOBANK, la información sobre el destino de las muestras estará a su disposición en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica con el fin de que pueda manifestar su conformidad o disconformidad con el fin previsto para las mismas.

v16-01-2014

CIBERER Biobank, Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) - CIF: G85296226
Centro Superior de Investigación en Salud Pública. Planta Segunda. Avda. de Cataluña, 21 CP 46020 - Tel. 96 348 4380 -
www.ciberer-biobank.es

2



EJEMPLAR PARA EL BIOBANCO

9. DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio enDNI..... y nº de SIP.....

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio enDNI.....en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente.....con DNI..... y nº de SIP.....

DECLARO

Que he leído la hoja de información que se me ha entregado.

Que he sido informado por el profesional de salud abajo mencionado sobre la donación de muestras a un biobanco.

Que he comprendido las explicaciones que se me han facilitado.

Que he podido realizar observaciones y me han sido aclaradas las dudas que he planteado.

Que puedo revocar el consentimiento en cualquier momento sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Que de forma libre y voluntaria realizo la donación de muestras de ☐ Sangre ☐ Tejido

Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas.

CONSIENTO

Que el Biobanco u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras donadas en las condiciones establecidas en la hoja de información.

Que el CIBERER Biobank pueda acceder a mis datos en la medida en que sea necesario y manteniendo siempre su confidencialidad.

Que el personal del CIBERER Biobank me contacte en el futuro en caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos y/o tomar nuevas muestras. ☐ Sí ☐ No

☐ Deseo incluir la siguiente restricción al uso de mis muestras:

.....

Fdo.: D./Dña

En a..... de de 20.....

Declaración del profesional de salud:

He informado debidamente al donante

Fdo.: Dr/a DNIColegiado Nº

En a de de 20.....

v16-01-2014

CIBERER Biobank, Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) - CIF: G85296226
Centro Superior de Investigación en Salud Pública. Planta Segunda. Avda. de Cataluña, 21 CP 46020 - Tel. 96 348 4380 -
www.ciberer-biobank.es

3



EJEMPLAR PARA EL CENTRO

9. DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio en DNI..... y nº de SIP.....

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio en DNI..... en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente..... con DNI..... y nº de SIP.....

DECLARO

Que he leído la hoja de información que se me ha entregado.

Que he sido informado por el profesional de salud abajo mencionado sobre la donación de muestras a un biobanco.

Que he comprendido las explicaciones que se me han facilitado.

Que he podido realizar observaciones y me han sido aclaradas las dudas que he planteado.

Que puedo revocar el consentimiento en cualquier momento sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Que de forma libre y voluntaria realizo la donación de muestras de ☐ Sangre ☐ Tejido

Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas.

CONSENTO

Que el Biobanco u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras donadas en las condiciones establecidas en la hoja de información.

Que el CIBERER Biobank pueda acceder a mis datos en la medida en que sea necesario y manteniendo siempre su confidencialidad.

Que el personal del CIBERER Biobank me contacte en el futuro en caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos y/o tomar nuevas muestras. ☐ Sí ☐ No

☐ Deseo incluir la siguiente restricción al uso de mis muestras:

.....

Fdo.: D./Dña

En a de de 20.....

Declaración del profesional de salud:

He informado debidamente al donante

Fdo.: Dr/a DNI Colegiado Nº

En a de de 20.....

V16-01-2014

3

CIBERER Biobank, Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) - CIF: G85296226
Centro Superior de Investigación en Salud Pública. Planta Segunda. Avda. de Cataluña, 21 CP 46020 - Tel. 96 348 4380 -
www.ciberer-biobank.es



EJEMPLAR PARA EL DONANTE

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo, D./Dña con DNI revoco el consentimiento prestado en fecha de de 20 y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

Fdo.:

En a de de 20.....

Yo, D./Dña, con DNI como representante legal de D/Dña, con DNI, revoco el consentimiento prestado en fecha de de 20..... y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada

Fdo.:

En a de de 20.....

V16-01-2014

4



EJEMPLAR PARA EL BIOBANCO

SOLICITUD DE INFORMACIÓN DE DATOS GENÉTICOS RESULTADO DE LAS INVESTIGACIONES

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio en
.....DNI..... y nº de
SIP.....

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio en
.....DNI.....en
calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del
paciente....., con DNI..... y nº de
SIP.....

SOLICITO

Ser informado/a del resultado de las investigaciones de la donación voluntaria realizada en fecha
.....de.....de 20.....si éstas afectan a mi salud o a la de mi representado.

Fdo.:

En a de de 20.....

V16-01-2014

5

CIBERER Biobank, Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) - CIF: G85296226
Centro Superior de Investigación en Salud Pública. Planta Segunda. Avda. de Cataluña, 21 CP 46020 - Tel. 96 348 4380 -
www.ciberer-biobank.es



EJEMPLAR PARA EL CENTRO

SOLICITUD DE INFORMACIÓN DE DATOS GENÉTICOS RESULTADO DE LAS INVESTIGACIONES

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio enDNI..... y nº de SIP.....

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio enDNI..... en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente....., con DNI..... y nº de SIP.....

SOLICITO

Ser informado/a del resultado de las investigaciones de la donación voluntaria realizada en fechade.....de 20.....si éstas afectan a mi salud o a la de mi representado.

Fdo.:

En a de de 20.....

V16-01-2014

5

CIBERER Biobank, Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) - CIF: G85296226
Centro Superior de Investigación en Salud Pública. Planta Segunda. Avda. de Cataluña, 21 CP 46020 - Tel. 96 348 4380 -
www.ciberer-biobank.es



EJEMPLAR PARA EL DONANTE

SOLICITUD DE INFORMACIÓN DE DATOS GENÉTICOS RESULTADO DE LAS INVESTIGACIONES

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio en
.....DNI..... y nº de
SIP.....

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio en
.....DNI.....en
calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del
paciente....., con DNI..... y nº de
SIP.....

SOLICITO

Ser informado/a del resultado de las investigaciones de la donación voluntaria realizada en fecha
.....de.....de 20.....si éstas afectan a mi salud o a la de mi representado.

Fdo.:

En a de de 20.....



EJEMPLAR PARA EL BIOBANCO

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA INMORTALIZACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

La immortalización de líneas celulares de linfocitos B obtenidos a partir de muestras de sangre es una técnica que se emplea con el fin de disponer de una fuente ilimitada de material biológico (esto es, células de Vd.) para realizar distintas investigaciones en ellas

El CIBERER Biobank va a establecer esta línea celular con su muestra para que los investigadores puedan acceder a una fuente inagotable de ADN de Vd. sin necesidad de volver a extraerle sangre.

Esto implica que la presente donación se hace por un periodo ilimitado, ya que sus células se immortalizarán y podremos obtener material de ellas de modo indefinido.

El CIBERER Biobank podrá poner a disposición de aquellos investigadores que lo soliciten las líneas celulares obtenidas de estas muestras.

Solo si Vd. lo solicita (mediante la revocación del presente consentimiento) se procederá a la destrucción de esta línea celular.

Mediante la firma de este documento autorizo al CIBERER Biobank a llevar a cabo el proceso de immortalización.

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio enDNI..... y nº de SIP.....

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio enDNI.....en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente....., con DNI..... y nº de SIP.....

Fdo.: D./Dña

En a..... de de 20.....



EJEMPLAR PARA EL CENTRO

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA INMORTALIZACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

La immortalización de líneas celulares de linfocitos B obtenidos a partir de muestras de sangre es una técnica que se emplea con el fin de disponer de una fuente ilimitada de material biológico (esto es, células de Vd.) para realizar distintas investigaciones en ellas

El CIBERER Biobank va a establecer esta línea celular con su muestra para que los investigadores puedan acceder a una fuente inagotable de ADN de Vd. sin necesidad de volver a extraerle sangre.

Esto implica que la presente donación se hace por un periodo ilimitado, ya que sus células se immortalizarán y podremos obtener material de ellas de modo indefinido.

El CIBERER Biobank podrá poner a disposición de aquellos investigadores que lo soliciten las líneas celulares obtenidas de estas muestras.

Solo si Vd. lo solicita (mediante la revocación del presente consentimiento) se procederá a la destrucción de esta línea celular.

Mediante la firma de este documento autorizo al CIBERER Biobank a llevar a cabo el proceso de immortalización.

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio enDNI..... y nº de SIP.....

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio enDNI.....en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente....., con DNI..... y nº de SIP.....

Fdo.: D./Dña

En a..... de de 20.....



EJEMPLAR PARA EL DONANTE

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA INMORTALIZACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

La immortalización de líneas celulares de linfocitos B obtenidos a partir de muestras de sangre es una técnica que se emplea con el fin de disponer de una fuente ilimitada de material biológico (esto es, células de Vd.) para realizar distintas investigaciones en ellas

El CIBERER Biobank va a establecer esta línea celular con su muestra para que los investigadores puedan acceder a una fuente inagotable de ADN de Vd. sin necesidad de volver a extraerle sangre.

Esto implica que la presente donación se hace por un periodo ilimitado, ya que sus células se immortalizarán y podremos obtener material de ellas de modo indefinido.

El CIBERER Biobank podrá poner a disposición de aquellos investigadores que lo soliciten las líneas celulares obtenidas de estas muestras.

Solo si Vd. lo solicita (mediante la revocación del presente consentimiento) se procederá a la destrucción de esta línea celular.

Mediante la firma de este documento autorizo al CIBERER Biobank a llevar a cabo el proceso de immortalización.

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio enDNI..... y nº de SIP.....

D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio enDNI.....en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente....., con DNI..... y nº de SIP.....

Fdo.: D./Dña

En a de de 20.....

V16-01-2014

6

CIBERER Biobank, Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) - CIF: G85296226
Centro Superior de Investigación en Salud Pública. Planta Segunda. Avda. de Cataluña, 21 CP 46020 - Tel. 96 348 4380 -
www.ciberer-biobank.es

9.3 Anexo III: Registro de datos clínicos

REGISTRO DE DATOS CLÍNICOS

Identificación (Iniciales):

Número registro:

Sospecha clínica:

1) DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS:

Fecha nacimiento	
Sexo	
Etnia	

2) ANTECEDENTES

	SI	NO	DESCONOCIDO	DESCRIPCIÓN
Alergias				
Antecedentes familiares				
Antecedentes oncológicos				
Enfermedades previas				
Cirugías previas				
Infecciones previas				
Hospitalizaciones previas				
Tratamiento actual				
Transfusiones recibidas (indicar nº último año)				Hematíes: Plaquetas:

Enfermedades asociadas:

	SI	NO	DESCONOCIDO	DESCRIPCIÓN
Talla baja				
Malformaciones musculoesqueléticas				
Alteraciones faciales				
Alteraciones cutáneas				
Malformación cardíaca				
Malformación renal				
Malformación cerebral				
Retraso del desarrollo				
Defecto cognitivo				
Malformación ocular				
Malformación genitourinaria				
Malformación digestiva				
Malformación ORL				
Otras				

3) EXPLORACIÓN FÍSICA

Edad: _____ años Peso: _____ kg Talla: _____ cm Lansky: _____ %		Peso al nacimiento: _____ Talla al nacimiento: _____ Semana parto: _____ Constantes (TA,FC, T°): _____	
	NORMAL	ALTERADO	DESCRIPCIÓN
Cabeza			
Piel			
Orofaringe			
Adenopatías			
Tórax			
Auscultación cardíaca			

Auscultación respiratoria			
Abdomen			
Extremidades			
Exploración neurológica			
Otros			

4) PRUEBAS COMPLEMENTARIAS

ANALÍTICA SANGUÍNEA

Fecha:

Parámetro	Resultado	Parámetro	Resultado
HEMOGRAMA			
Hematíes	x 10 ¹² /L	Leucocitos	x 10 ⁹ /L
Hemoglobina	g/dL	Neutrófilos	x 10 ⁹ /L
Hematocrito	%	Linfocitos	x 10 ⁹ /L
VCM	fl	Monocitos	x 10 ⁹ /L
Plaquetas	x 10 ⁹ /L	Eosinófilos	x 10 ⁹ /L
Reticulocitos	%	Basófilos	x 10 ⁹ /L
BIOQUÍMICA			
Urea	mg/dL	LDH	U/L
Creatinina	mg/dL	Proteínas totales	g/dL
Ácido úrico	mg/dL	Albúmina	g/dL
Glucosa	mg/dL	Sodio	mmol/L
AST/ALT	U/L	Potasio	mmol/L
Bilirrubina total	mg/dL	Cloro	mmol/L
Bilirrubina directa	mg/dL	Fósforo	mg/dL
Gamma-GT	U/L	Calcio	mg/dL
Fosfatasa alcalina	U/L	PCR	mg/dL

ESTUDIO MÉDULA ÓSEA

Fecha:

Aspirado MO:

Parámetro	Resultado	No disponible	Significativo
Contenido celular			
Contenido megacariocitos			
Blastos (%)			
Promielocitos (%)			
Mielocitos (%)			
Metamielocitos (%)			
Células en banda (%)			
Segmentados (%)			
Eosinófilos (%)			
Basófilos (%)			
Linfocitos (%)			
Monocitos (%)			
Eritroblastos (%)			
Celularidad (cels/ml)			
CD34+/ml			
CD34+ (%)			
COMENTARIOS:			

Biopsia MO:

ESTUDIOS CITOGENÉTICOS	
Cariotipo	
Alteración	
Técnica	
OTROS ESTUDIOS GENÉTICOS REALIZADOS	

OTRAS EXPLORACIONES ESPECÍFICAS DE SU CUADRO CLÍNICO:

Enfermedad	Estudio	Resultado	No realizado
Anemia Blackfan-Diamond	ADA eritrocitario		
Anemia de Fanconi	Roturas cromosómicas inducidas (BEB y MMC)		
Shwachman-Diamond	Tripsinógeno e isoamilasa Cuantificación grasa fecal		
Disqueratosis congénita	Longitud de telómeros		
Trombocitopenia amegacariocítica	Niveles TPO		
Trombopenia con ausencia de radio	Niveles TPO Rx brazo		
Síndrome de Seckel	Roturas cromosómicas espontáneas		
Ataxia-teleangiectasia	Niveles AFP		
Síndrome de Nijmegen	Alteración tamaño nibrina Roturas cromosómicas espontáneas		
Síndrome Bloom	Intercambio cromátidas hermanas en linfocitos sp		
Síndrome Pearson	Vacuolización células MO		
Disgenesia Reticular	Mutaciones gen adenilato quinasa 2		
Otras			

9.4 Anexo IV: Clasificación ACMG

ACMG STANDARDS AND GUIDELINES

RICHARDS *et al* | Interpretation of sequence variants

Table 3 Criteria for classifying pathogenic variants

Evidence of pathogenicity	Category
Very strong	<p>PVS1 null variant (nonsense, frameshift, canonical ± 1 or 2 splice sites, initiation codon, single or multiexon deletion) in a gene where LOF is a known mechanism of disease</p> <p>Caveats:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Beware of genes where LOF is not a known disease mechanism (e.g., <i>GFAP</i>, <i>MYH7</i>) • Use caution interpreting LOF variants at the extreme 3' end of a gene • Use caution with splice variants that are predicted to lead to exon skipping but leave the remainder of the protein intact • Use caution in the presence of multiple transcripts
Strong	<p>PS1 Same amino acid change as a previously established pathogenic variant regardless of nucleotide change</p> <p>Example: Val→Leu caused by either G>C or G>T in the same codon</p> <p>Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level</p> <p>PS2 De novo (both maternity and paternity confirmed) in a patient with the disease and no family history</p> <p>Note: Confirmation of paternity only is insufficient. Egg donation, surrogate motherhood, errors in embryo transfer, and so on, can contribute to nonmaternity.</p> <p>PS3 Well-established in vitro or in vivo functional studies supportive of a damaging effect on the gene or gene product</p> <p>Note: Functional studies that have been validated and shown to be reproducible and robust in a clinical diagnostic laboratory setting are considered the most well established.</p> <p>PS4 The prevalence of the variant in affected individuals is significantly increased compared with the prevalence in controls</p> <p>Note 1: Relative risk or OR, as obtained from case-control studies, is >5.0, and the confidence interval around the estimate of relative risk or OR does not include 1.0. See the article for detailed guidance.</p> <p>Note 2: In instances of very rare variants where case-control studies may not reach statistical significance, the prior observation of the variant in multiple unrelated patients with the same phenotype, and its absence in controls, may be used as moderate level of evidence.</p>
Moderate	<p>PM1 Located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain (e.g., active site of an enzyme) without benign variation</p> <p>PM2 Absent from controls (or at extremely low frequency if recessive) (Table 6) in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium</p> <p>Caveat: Population data for insertions/deletions may be poorly called by next-generation sequencing.</p> <p>PM3 For recessive disorders, detected in trans with a pathogenic variant</p> <p>Note: This requires testing of parents (or offspring) to determine phase.</p> <p>PM4 Protein length changes as a result of in-frame deletions/insertions in a nonrepeat region or stop-loss variants</p> <p>PM5 Novel missense change at an amino acid residue where a different missense change determined to be pathogenic has been seen before</p> <p>Example: Arg156His is pathogenic; now you observe Arg156Cys</p> <p>Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level.</p> <p>PM6 Assumed de novo, but without confirmation of paternity and maternity</p>
Supporting	<p>PP1 Cosegregation with disease in multiple affected family members in a gene definitively known to cause the disease</p> <p>Note: May be used as stronger evidence with increasing segregation data</p> <p>PP2 Missense variant in a gene that has a low rate of benign missense variation and in which missense variants are a common mechanism of disease</p> <p>PP3 Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.)</p> <p>Caveat: Because many in silico algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm should not be counted as an independent criterion. PP3 can be used only once in any evaluation of a variant.</p> <p>PP4 Patient's phenotype or family history is highly specific for a disease with a single genetic etiology</p> <p>PP5 Reputable source recently reports variant as pathogenic, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation</p>

LOF, loss of function; OR, odds ratio.

ACMG STANDARDS AND GUIDELINES	
Interpretation of sequence variants RICHARDS <i>et al</i>	
Table 4 Criteria for classifying benign variants	
Evidence of benign impact	Category
Stand-alone	BA1 Allele frequency is >5% in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium
Strong	<p>BS1 Allele frequency is greater than expected for disorder (see Table 6)</p> <p>BS2 Observed in a healthy adult individual for a recessive (homozygous), dominant (heterozygous), or X-linked (hemizygous) disorder, with full penetrance expected at an early age</p> <p>BS3 Well-established in vitro or in vivo functional studies show no damaging effect on protein function or splicing</p> <p>BS4 Lack of segregation in affected members of a family</p> <p>Caveat: The presence of phenocopies for common phenotypes (i.e., cancer, epilepsy) can mimic lack of segregation among affected individuals. Also, families may have more than one pathogenic variant contributing to an autosomal dominant disorder, further confounding an apparent lack of segregation.</p>
Supporting	<p>BP1 Missense variant in a gene for which primarily truncating variants are known to cause disease</p> <p>BP2 Observed in trans with a pathogenic variant for a fully penetrant dominant gene/disorder or observed in cis with a pathogenic variant in any inheritance pattern</p> <p>BP3 In-frame deletions/insertions in a repetitive region without a known function</p> <p>BP4 Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.)</p> <p>Caveat: Because many in silico algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm cannot be counted as an independent criterion. BP4 can be used only once in any evaluation of a variant.</p> <p>BP5 Variant found in a case with an alternate molecular basis for disease</p> <p>BP6 Reputable source recently reports variant as benign, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation</p> <p>BP7 A synonymous (silent) variant for which splicing prediction algorithms predict no impact to the splice consensus sequence nor the creation of a new splice site AND the nucleotide is not highly conserved</p>

Table 5 Rules for combining criteria to classify sequence variants

Pathogenic	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Very strong (PV51) AND <ul style="list-style-type: none"> (a) ≥ 1 Strong (PS1–PS4) OR (b) ≥ 2 Moderate (PM1–PM6) OR (c) 1 Moderate (PM1–PM6) and 1 supporting (PP1–PP5) OR (d) ≥ 2 Supporting (PP1–PP5) (ii) ≥ 2 Strong (PS1–PS4) OR (iii) 1 Strong (PS1–PS4) AND <ul style="list-style-type: none"> (a) ≥ 3 Moderate (PM1–PM6) OR (b) 2 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 2 Supporting (PP1–PP5) OR (c) 1 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 4 supporting (PP1–PP5)
Likely pathogenic	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Very strong (PV51) AND 1 moderate (PM1–PM6) OR (ii) 1 Strong (PS1–PS4) AND 1–2 moderate (PM1–PM6) OR (iii) 1 Strong (PS1–PS4) AND ≥ 2 supporting (PP1–PP5) OR (iv) ≥ 3 Moderate (PM1–PM6) OR (v) 2 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 2 supporting (PP1–PP5) OR (vi) 1 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 4 supporting (PP1–PP5)
Benign	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Stand-alone (BA1) OR (ii) ≥ 2 Strong (BS1–BS4)
Likely benign	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Strong (BS1–BS4) and 1 supporting (BP1–BP7) OR (ii) ≥ 2 Supporting (BP1–BP7)
Uncertain significance	<ul style="list-style-type: none"> (i) Other criteria shown above are not met OR (ii) the criteria for benign and pathogenic are contradictory

